

⑥日本国特許庁 (JP)  
⑦公表特許公報 (A)

⑧特許出願公表  
平5-504889

⑨Int. Cl. <sup>5</sup> C 12 Q 1/68 C 12 N 15/11	識別記号 ZNA	序内整理番号 A 8931-4B C 12 N 15/00	審査請求有 子備審査請求有 部門(区分) 1 (1) A※ (全 60 頁)
---	-------------	--	--

⑩公表 平成5年(1993)7月29日

⑪発明の名称 16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプローブ

⑫特 願 平3-508127

⑬翻訳文提出日 平4(1992)10月19日

⑭出 願 平3(1991)4月18日

⑮国際出願 PCT/EP91/00743

⑯国際公開番号 WO91/16454

⑰国際公開日 平3(1991)10月31日

優先権主張 ⑪1990年4月18日⑫欧州特許機構(E P)⑬90401054.3

⑪発明者 ロツサウ, リュディ  
ベルギー国、ベー-2070・エケレン、ウイルヘフーベストラート。  
45

⑫出願人 エヌ・ベー・イノヘネティク  
ベルギー国、ベー-9710・ヘント、ポックス・4、インドウストリ  
ーバルク・ズペイナールデ・7

⑬代理人 弁理士 川口 義雄 外3名

⑭指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域  
特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), H U, I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N  
L(広域特許), S E(広域特許), U S

最終頁に統く

請求の範囲

1. 非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細胞のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチドースペーサー領域のはば最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15～約100ヌクレオチドから構成されるプローブ。

2. 検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細胞に固有であるように選択されたrRNA遺伝子間のスペーサー領域、特に16S rRNA遺伝子及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイゼするため十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブであって、rRNA遺伝子間のスペーサー領域の前記配列が、

- \* 目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近開拓のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較し、
- \* 最近開拓のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少な

くとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15～ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15～約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又は

- \* 射線スペーサー領域を得るように、目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域からrRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ、

\* 少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15～スペーサー領域のはば最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15～約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイゼすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより、

選択されることを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

3. 一核酸グループ：

グループNCII:

CCATGGCTCG TTATTCTACT TCAC	NCII
CCGAAGTACA ATAACCACCC ATCC	NCIIIC
CCGAAGUACA AUAAACCACCC AUCC	NCIICR
CGAUCCGUCC UUAUUCUACU UCAC	NCIIR

グループNCIIZ:

特表平5-504889 (2)

TTGGTTTACG TACCCGTTGA CTAACTAAGC AAAC	NCI2	TGCCCTTCAT ATTCCCTATCT ACTGTGCA	NM14
CTTTOCTTAC TTACTCAAGC CGTAGCTAAA CGAA	NCI2IC	TCCACACTAG ATAGCAATAT CGAACCCA	NM14IC
GUUUCCUUAC UUAGGCAACC CGUACGUAAA CGAA	NCI2ICR	UCCACACUAG AUAGCAAUUAU CGAACCCA	NM14CR
UGGGUUDACC UACCCGUUGA CGAACUAGC AAAC	NCI2R	UGCCUUCGCU AUUGGUUACU ACUGUGCA	NM14R
グループ NM1:			
GCTCAACTGT GACCGCGCCC TG	NM11	TTTCTCTTGTCAGTGTGACCTCCCCCTEAATGCATTCTGTTCCATT	
CAGGGCGAGC TCACACTTGA CC	NM11IC		NM15
CAGGGCGAGC UCACACUUGA CC	NM11ICR	AATCGAACAGAACATTCATTCAGGGCACGTCAACATTCACCAAGAACAAAAA	
GGCUAAGUGG GACCGCGCCC UG	NM11R		NM15IC
グループ NM12:			
GTTCTTCGTC AACGTGTCAGC TG	NM12		NM15ICR
GACGTCACAC TTCACCAAGA AC	NM12IC	UUUUGUUCUUGGUACAGUGUGACCUCCCCUGAAUGCAUUCGUUCCAUU	
GACCUACAC UUGACCAAGA AC	NM12ICR		NM15R
GUUCUUGUC AAGUGUGAGC UC	NM12R	グループ NM16:	
グループ NM13:			
CCCTTCGTTA TACCTATCTA CTGTC	NM13	TTGGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC	NM16
CCACACTACA TACCTATAAC GAACCC	NM13IC	GTCTGATGTT CTAGTCACCG CAATGTTAAC CAAA	NM16IC
CCACAGUAGA UACCUUAAAC GAACCC	NM13ICR	GCGUGAUGUU CGACGUACCG GAAGGUUAGC CAAA	NM16ICR
CCGUUCGUUA UACCUUACUA CGUGCC	NM13R	UUUGCCUAAAC AUUCCGUUGA CGAGAACACG AGAC	NM16R
グループ NM14:			
		TTATTATGCC CGAGGCATAT TG	HDII

CAATATGCC CGCCGATAAT AA	HDIIIC	AACTGCGTC AATTTCATCC GT	HI11IC
CAAUAUGCCU CGCCGCAUAAU AA	HDIIICR	AAAGUCCGUC AAUUGUAUCG GU	HI11ICR
UUUUUAUGCC CGAGCCGAAUU UC	HDIIIR	ACGCAUAAA UGAGCCGCAU GU	HI11R
グループ BCII:			
TTAAACATCT TACCAAAE	BCII	ACTTTCAGT GAAAATTTAA AG	BI12
CTTTGCTAAC ATCTTTAAK	BCIIIC	CTTTAAGTTT TCACCTTCAA GT	BI12IC
CGUUCGUAAAC AUCUUUAA	BCIIICR	CUUUAACUUU UCACGUUAAA GU	BI12ICR
UAAAACAUU UACCAAAAC	BCIIR	ACUUUGAGU GAAAACUAAA AG	BI12R
グループ BCI2:			
TTCATCTTA AACTTGCTTG CTGCA	BCI2	AAATCGAAAGG TTCAAAATGT T	SA11
TCCACCAAGC AACTTAAAC ATCAA	BCI2IC	AAACAAATTCA ACCTTTCGAT T	SA11IC
UCCACCAAGC AACUUUAAAAC AUCAA	BCI2ICR	AAACAAUUGA ACCUUUCCAU U	SA11ICR
UUGAUGGUUA AACUUCGUG CGGCA	BCI2R	AAUCCGAAAGG UUCAAAAUUGU U	SA11R
グループ BPII:			
CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BPII	CGAAACCTGC CATTTGGCTC TT	SA12
AAAGCCTGTC AGACCATGCG TCTGC	BPIIIC	AAACACCCAAA TCCGAGGTTT CC	SA12IC
AAAGCCUGGCC AGAGGAUGCC UGUGG	BPIIICR	AAACACCCAAA UGGCAGGUUU CC	SA12ICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA CCCUD	BPIIR	CGAAACCCUCG CAUUGGCCAU GU	SA12R
グループ HI11:			
ACCCATCAAA TTGACCCGAC TT	HI11	TCCACCATCT AGAAATAGAT TCTAGAA	SA13

特表平5-504889 (3)

TTCTACAAATC TATTTCCTAGA TCGTGGG	SA13IC	TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SP13IC
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCCUGGA	SA13ICR	UUCUACCUU UCACUCAUAA ACUC	SP13ICR
UCCACCAUCU AGAAAUAAGAU UGUACGAA	SA13R	GACGUUAUGA CGCAAGGUC AGAA	SP13R
グループ SA14:		から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は	
TCTACTTTTA AAGAAACTAG CTT	SA14	下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズする	
AACCTACTTT CTTTAAACT AGA	SA14IC	という条件下で、	
AACCUAGUUU CUUAAAACU AGA	SA14ICR	一、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、	
UCUAGGUUDA AAGAAACUAG GUD	SA14R	・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、	
グループ SP11:		・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載のプローブ。	
GTGAGAGATC ACCAAAGTAAT GCA	SP11	4. 1種以上の <u>Neisseria gonorrhoeae</u> 株を検出するためのプローブであって、	
TCCATTACTT CCTCATCTCT CAC	SP11IC	—核酸グループ:	
UCCADUACUU CGUGAUCUCU CAC	SP11ICR	グループ NGII:	
CUGACAGAUC ACCAACGUAAU GCA	SP11R	CGATGCCCTCG TTATTCTACT TCGC	NGII
グループ SP12:		GGAACTAGA ATAACCACCC ATCG	NGIIIC
ACGAACCTGCC CATTGCCCTT	SP12		
AACACCAATC CCCAGTTCCY	SP12IC		
AACACCAAUU CGCACGUUCCU	SP12ICR		
ACGAACCUCC CAUUCCUCUU	SP12R		
グループ SP13:			
GAGTTTATGA CTGAAAGCTC AGAA	SP13		

CCGAACUACA AUAAACGACCC AUCC  
CCAUCCGUCC UUAUUCUACU UCCC  
グループ NC12:  
TTCCGTTTACG TACCCGTTAG CTAAGTAACG AAAC NC12  
CTTTCCTTACG TTACTCAACG CCTAGCTAAA CGAA NC12IC  
GUUUCGUUACU UUACUCAACG CGUACGUAAA CGAA NC12ICR  
GUCCGUUUACG UACCCGUUCA CGUACGUACG AAAC NC12R  
から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は  
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズする  
という条件下で、  
一、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、  
・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、  
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。  
5. 生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae株を検出するための方法であって、場合に

よりプローブの標的配列を夾みする (flanking)  
2種のアライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のアライマーを介するポリメラーゼ链反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のプローブと検出させる段階と、特にサンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。  
6. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%F1co11、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ボリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの算新変性サ

ケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、2.5 mMリン酸緩衝液pH7、1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項4に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50°Cの範囲及び／又は洗浄温度が約50°Cの範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

CCGAACCTAGA ATAACCACCC ATCG

HT及び／又はWT：50°C、

GGUUCUUAUC UAGGCAACCC CGUACGUAAA CGAA

HT及び／又はWT：50°Cであることを特徴とする請求項5に記載の生物学的サンプル中で*Neisseria gonorrhoeae*を検出するための方法。

7. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全*Neisseria gonorrhoeae*株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

－請求項4に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、

－これらのアローブと多数、好ましくは全*Neisseria*

#### 特表平5-504889 (4)

*gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

－同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が*Neisseria gonorrhoeae*に対して特異的であり且つ請求項4に記載のアローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のアローブと、

－これらのアローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

－固体支持体に固定された請求項4に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、

－該アローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

－酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのアローブと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

－前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

8. 1種以上の*Neisseria meningitidis*株を検出するためのアローブであって、

－該群グループ：

グループNNI1:

CCTCAACTGT GACCTCCCC TG

NNI1

CAGGGCCAGC TCACACTTCA CC

NNI1IC

CAGGGCCAGC UCACACUUGA CC

NNI1ICR

CCUCAACUGU GAGGUCCCCC UC

NNI1R

グループNNI2:

GTTCTTCGTC AAGTGTGACG TC

NNI2

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

NNI2IC

CACCUACAC UUGACCAAGA AC

NNI2ICR

GUUCUUGGUC AACUGUGACCC UC NNI2R

グループNNI3:

CCGTTCCGTTA TAGCTTATCTA CTGTCC NNI3

CCACACTACA TACCTATAAC GAACCC NNI3IC

CCACAGUAGA UAGCUAUAC GAACCC NNI3ICR

CCGUUCGGAU UAGCUAUCA CUCUGC NNI3R

グループNNI4:

TCCGTTCCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCC NNI4

TCCACACTAG ATAGCAATAT CGAACCGA NNI4IC

UCCACACUAG AUACCAAUAU CGAACCGA NNI4ICR

UGCCGUCCAU AUUCCUAUCU ACUGUCCA NNI4R

グループNNI5:

TTTTGTTCTTGCTCAAGTGTGACCTGCCCCCTGAATGCATTCTGTTCCATT NNI5

AATGGAACAGAAATCCATTCAAGGGCCACGTCAACATTCAACAAACAAAAA NNI5IC

AAUGGAACAGAAUCCAUUCACGGCCACGUACACUUGACCAAGAACAAAAA NNI5ICR

UUUUCGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCCCCUGAAUCCGACUUCGUUCCAUU NNI5R

持表平5-504889 (5)

グループNNIB:

TTCCTCAAC	ATTCCTTCA	CTAGAACATC	ACAC	NM16
CTCTCATTT	CTACTCAACC	GAATTTTACG	CAAA	NM16IC
CUCUCAUGUU	CUACUCAACC	GAUAGUUAGG	CAAA	NM16ICR

から選択される核酸に属しており且つ15-選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標識配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか。
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

9. 生物学的サンプル中で *Neisseria meningitidis* 様を検出するための方法であつて、場合によりアロープの順的配列を交叉する 2 種のプライマー、より詳しくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介

ロープが請求項8に記載のアロープのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40～58℃の範囲及び又は洗浄温度が約40～58℃の範囲に適宜調節され、特に、前記要件と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々。

**CAGGGGACCC TCAACATTTGA CC**

H T & U / 又は W T : 45°.

GACGTCAACAC TTGACCCAGA AC

HT及び/又はWT: 45℃.

CCACACTACA TAGCTATAAC GAAAGC

H T及び／又は W T : 40°C.

TCACACTAG ATACCAATAT CGAACCCG

HT及び／又はWT：48℃

TTTGTCTTCGGTCAACGTGTGACCGTCCCC

HT及び／又はWT: 58°C.

**CTCTCATCTT CTACTCAACC CAATGTTAEG CAAA**

HT及びノ文はWT：50%であることを特徴とする諸疾  
項うち記載の生物学的サンプル中で *Neisseria*  
*meningitidis*を検出するための方法。

11. 生物学的サンプル中で多數、好ましくは全 N の 1/2

するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項8に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。  
10. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0）、約2.5mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、2.5mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア

seria meningitisidis様をin vitro  
に検出するためのキットであって、

- 請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと

-これらのアローブと多数、軽ましくは全 *Neisseria meningitidis* 株の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを遺傳子出力ための手段として用ひる。又は

同一核酸分子を標的にし、少なくとも 1 種が Neisseria meningitidis に対して特異的であり且つ請求項 8 に記載のアロープのいずれか 1 種から選択されるをもととする。

-これらのプローブと *Neisseria meningitidis* 株の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するため必要な成分と。

<sup>1</sup> 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッド。

## 特表平5-504889 (6)

GUAUUAUCCG CGAGGCAUAU UC

BDIIIR

から選択される核酸に算しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA様的ハイブリダイズするという条件下で。

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

13. 生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの様的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得

- ドを適時検出するための手段とを含むか、又は
- 固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
- 該プローブの様的配列を含むDNA及び/又はRNAの選素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
- 選素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Neisseria meningitidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

12. 1種以上の Haemophilus ducreyi 株を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ：

グループBDII:

TTATTATGCC CGAGGCATAT TC

BDII

CAATATCCCT CGGGCATAAT AA

BDIIIC

CAAUAUCCCU CGGCCAUAAU AA

BDIIICR

る Haemophilus ducreyi 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Haemophilus ducreyi 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

14. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項12に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、前記様的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)

及び洗浄温度(WT)が夫々、

CAATATCCCT CGGGCATAAT AA

HT及び/又はWT: 40℃であることを特徴とする請求項13に記載の生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi 株を検出するための方法。

15. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Haemophilus ducreyi 株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

- 請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは全 Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的的にし、少なくとも1種が Haemophilus ducreyi に対して特異的であり且つ請求項12に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

-これらのプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項1-2に記載のプローブと、いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Haemophilus ducreyi 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

16. 1種以上の Branhamella catarrhalis 株を検出するためのプローブであって、

-その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

17. 生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 株を検出するための方法であって、場合によりアプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アプローブとサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 五株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のアプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

18. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

-核酸グループ:

グループBCI1:

TTAAACATCT TACCAAAAG

BCI1

CTTTCGTAAG ATGTTTAA

BCI1IC

CUUUCGUUAAG AUGUUUAA

BCI1ICR

UUAAAACAUU UACCAAAAG

BCI1R

グループBCI2:

TTGATGTTTA AACTTGGTTG CTGGA

BCI2

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

BCI2IC

UCCACCAAGC AAGUUUAAAAC AUCAA

BCI2ICR

UUGAUGGUUA AACGUUGGUUG CGGCA

BCI2R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもアプローブが対応する非標的配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

-・先々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もししくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

ナトリウム、pH 7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの質保性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアプローブが請求項16に記載のアプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30～42℃の範囲及び/又は洗浄温度が約30～42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が先々。

CTTTCGTAAG ATGTTTAA

HT及び/又はWT: 30℃

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

HT及び/又はWT: 42℃であることを特徴とする請求項17に記載の生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 株を検出するための方法。

19. 生物学的サンプル中で多數、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 株を In Vitro

特表平5-504889 (8)

- tro 検出するためのキットであって、  
- 請求項 1-6 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、  
- これらのプローブと多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができた緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
- 同一核酸分子を標的にして、少なくとも 1 種が Branhamella catarrhalis 株に対して特異的であり且つ請求項 1-6 に記載のプローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のプローブと、  
- これらのプローブと Branhamella catarrhalis 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができた緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

から選択される核酸に属しており且つ 1-5 ～ 選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は  
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標準配列と同一の RNA 又は DNA 様的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・ 夫々の末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・ 前記配列のいずれかで 1 種以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

21. 生物学的サンプル中で Bordetella pertussis 株を検出するための方法であって、場合によりアーロープの標的配列を夾みする 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介するポリメラーゼ鍵反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Bordetella pertussis 株の相補的

ー 固体支持体に固定された請求項 1-6 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、  
- 该プローブの標的配列を含む DNA 及び／又は RNA の酵素的增幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
- 酵素的增幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと Branhamella catarrhalis 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができた緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

20. 1 種以上の Bordetella pertussis 株を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ：

グループ BPII:

CCACACCCAT CCTCTGCAACA CGCTT	BPII
AACCTGTGCC AGAGGATGGG TGTGC	BPIIIC
AAACCCUGUCC ACACCAUCGG UCUCG	BPIIICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA CCCUU	BPIIR

核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項 20 に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Bordetella pertussis 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

22. ハイブリダイゼーション媒体が、約 3 × SSC (1 × SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0)、約 2.5 mM のリン酸緩衝液 pH 7.1, 2.0% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll, 0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルビロリドン及び約 0.1 mg/mL の剪断変性サケ精子 DNA を含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約 3 × SSC, 2.5 mM リン酸緩衝液 pH 7.1 及び 2.0% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項 20 に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約 55 °C の範囲及び／又は洗浄温度が約 55 °C の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々。

特表平5-504889 (9)

AACCCCTGTCAC AGAGGATGGC TGTGG

HT及び／又はWT: 55°Cであることを特徴とする請求項21に記載の生物学的サンプル中でBordetella pertussisを検出するための方法。

23. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Bordetella pertussis株を in vitro 検出するためのキットであって、

- 請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは全Bordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBordetella pertussisに対して特異的であり且つ請求項20に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブとBordetella pertu

ss株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 该プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

24. 1種以上のHaemophilus influenzae株を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ：

グループHII1:

ACCCATCAAA TTGACCCAC TT	HII1
AACTGCCGTC AATTGATGC GT	HII1IC
AAUCGGCGUC AAUUVUCAUCG CG	HII1ICR
ACGAUCAAAA UGACACCCAC GU	HII1R

グループHII2:

ACTTTGAACT GAAAACCTAA AC	HII2
CTTTAACGTT TCACCTCAAA GT	HII2IC
CUUUUAACGUU UCACUUCAA GU	HII2ICR
ACUUUGAAGU GAAAACQUAA AG	HII2R

から選択される核酸に属しており且つ1種～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標的配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- 実々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- 前記配列のいずれかで1種以上のヌクレオチドが置換されているか、

- その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

25. 生物学的サンプル中でHaemophilus influenzae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鍵反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

26. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1

特表平5-504889 (10)

ophilus influenzae 株を in vitro 検出するためのキットであつて、

- 請求項 24 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは全 Haemophilus influenzae 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的とし、少なくとも 1 種が Haemophilus influenzae に対して特異的であり且つ請求項 24 に記載のプローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のプローブと、

- これらのプローブと Haemophilus influenzae 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

$\times$  SSC = 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約 25mM のリン酸緩衝液 pH 7.1、20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1mg/ml の剪断変性サケ精子 DNA を含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約 3 $\times$  SSC、25mM リン酸緩衝液 pH 7.1 及び 20% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項 24 に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約 35~55℃ の範囲及び/又は洗浄温度が約 35~55℃ の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々、

AACTGCCGTC AATTTCATCC GT

HT 及び/又は WT : 55℃.

CTTTAACCTT TCACTTCAAA GT

HT 及び/又は WT : 35℃ であることを特徴とする請求項 25 に記載の生物学的サンプル中で Haemophilus influenzae を検出するための方法。

27. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Haem

ドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項 24 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、
- 該プローブの標的配列を含む DNA 及び/又は RNA の酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、
- 酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Haemophilus influenzae 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

28. 1 種以上の Streptococcus pneumoniae 株を検出するためのプローブであつて、

- 構成グループ：

グループ SPI1:

CTCACACATE ACCAAAGTAAT GCA SPI1

TGCATTACTT CCTCATCTCT CAC SPI1IC

UGCAUBACUB CGCGAUCUUCU CAC SPI1ICR

GUCACACAUCAU ACCAAUCAAU GCA SPI1R

グループ SPI2:

ACCAACTGGG CATTCGTCTT SPI2

AACACCAATG CCCACTTCCT SPI2IC

AACACCCAUG CGCACGUUCU SPI2ICR

ACCAACUGCC CAUUGGCUUU SPI2R

グループ SPI3:

CAGTTTATCA CTGAAAGCTC AGAA SPI3

TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC SPI3IC

UUCUGACCUU UCACGUUAAC ACUC SPI3ICR

CAGUDUUAUGA CUGAAAGUC AGAA SPI3R

から選択される核酸に属しております且つ 15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一の RNA 又は DNA 様的とハイブリダイズするという条件下で、

- 夫々の末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- 前記配列のいずれかで 1 種以上のヌクレオチドが置換されているか、

特表平5-504889 (11)

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

29. 生物学的サンプル中で Streptococcus pneumoniae 株を検出するための方法であって、場合によりアローブの標的配列を交叉する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA 又は RNA）を必要に応じて適切な条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アローブとサンプル中に存在し得る Streptococcus pneumoniae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項 28 に記載のアローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

30. ハイブリダイゼーション媒体が、約 3 × SSC (1 × SSC = 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸

ナトリウム、pH 7.0)、約 2.5mM のリン酸緩衝液 pH 7.1, 20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll, 0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1mg/ml の剪断完整性サケ精子 DNA を含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約 3 × SSC, 2.5mM リン酸緩衝液 pH 7.1 及び 20% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項 24 に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約 45°C の範囲及び／又は洗浄温度が約 45°C の範囲に適宜選択され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が失々、

TCCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HT 及び／又は WT : 45°C,

AAGACCAATC CGCACTTCCT

HT 及び／又は WT : 45°C,

TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC

HT 及び／又は WT : 45°C であることを特徴とする請求項 29 に記載の生物学的サンプル中で Streptococcus pneumoniae を検出するための方法。

31. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

- 請求項 28 に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、

- これらのアローブと多数、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的にし、少なくとも 1 種が Streptococcus pneumoniae に対して特異的であり且つ請求項 28 に記載のアローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のアローブと、

- これらのアローブと Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項 28 に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、

- 該アローブの標的配列を含む DNA 及び／又は RNA の酵素的増幅を適時実施するために必要なアライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのアローブと Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

32. 1 種以上の Streptococcus agalactiae 株を検出するためのアローブであって、

- 核酸グループ A:

グループ SAI1: AATCGAAAGG TTCAAATTGT T SAI1

AACAATTGCA ACCTTCCAT T SAI1IC

特表平5-504889 (12)

AACAAUUGUA ACCUDUCCAU U	SA11CR
AAUCGAAAGG UUCAAAUCU U	SA11R
グルーパ SA12:	
CGAAACCTGC CATTGCGTC TT	SA12
AAGACCCAAA TGGCAGGTTC CC	SA12IC
AAGACCCAAA UCCCACGUUU CC	SA12CR
CGAAACCDCC CAUUCGCCUC UU	SA12R
グルーパ SA13:	
TCCACCATCT AGAAAATAGAT TCTAGAA SA13	
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCCCTGGA SA13IC	
GUCAUACAUC UABUUCUAGA UCCUGGA SA13CR	
UCCACCAUCU AGAAAUAAGAU UCUACAA SA13R	
グルーパ SA14:	
TCTACTTTA AACAAACTAC GTT	SA14
AACCTACTTT CTAACTAAACT AGA	SA14IC
AACCUACGUU CUUAAAACU AGA	SA14ICR
UCUAGGUUA AACAAACUAG GUU	SA14R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は  
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾

配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズする  
という条件下で。

- 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか。
- 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか。
- その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

33. 生物学的サンプル中で Streptococcus  
agalactiae 株を検出するための方法であって、場合によりアロープの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鍵反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アロープとサンプル中に存在し得る Streptococcus agalactiae 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項32に記載のアロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Strept

coccus agalactiae 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

34. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアロープが請求項32に記載のアロープのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35~45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35~45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AACAATTGCA ACCTTTCCAT T  
HT及び/又はWT: 35℃.

AAGACCCAAA TGGCAGGTTC CC  
HT及び/又はWT: 45℃.  
TCTCTACAATC TATTTCTAGA TCCCTGGA  
HT及び/又はWT: 45℃.  
AACCTACTTT CTAACTAAACT AGA

HT及び/又はWT: 37であることを特徴とする請求項33に記載の生物学的サンプル中で Streptococcus agalactiae を検出するための方法。

35. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Streptococcus agalactiae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

-請求項32に記載のアロープのいずれかから選択された少なくとも1種のアロープと、

-これらのアロープと多数、好ましくは全 Streptococcus agalactiae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

特表平5-504889 (13)

-同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Streptococcus agalactiae に対して特異的であり且つ請求項32に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと。

-これらのプローブと Streptococcus agalactiae 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと。

-該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと Streptococcus agalactiae 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

ドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

36. 1種以上の Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 由来のDNA及び／又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び／又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23S rRNAスペーサー配列から説明される15~最大数のヌクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブ。

37. 生物学的サンプル中で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ錠反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サ

ンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項36に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

38. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を in vitro 検出するためのキットであって、

-請求項36に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-これらのプローブと多数、好ましくは全 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液

又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli に対して特異的であり且つ請求項36に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと。

-これらのプローブと Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項36に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと

特表平5-504889 (14)

Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な標榜液又は該標榜液を生成するために必要な成分と。

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

39. 検出すべき微生物に特異的な請求項 1 から 4、8、12、16、20、24、28、32 及び 36 のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンプル中に含まれる 1 種の微生物又は数種の微生物を同時に in vitro 検出するための方法であって、好ましくはプローブ領域を交叉する少なくとも 1 組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（標的配列を含む）DNA 及び / 又は RNA を標識し、増幅した標的配列と膜上のプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1 種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより

形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とする方法。

40. 生物学的サンプル中に含まれる 1 種の微生物又は数種の微生物を同時に in vitro 検出するためのキットであって、

- 検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項 1 から 4、8、12、16、20、24、28、32 及び 36 のいずれか一項に記載のプローブの少なくとも 1 種と、

- 該プローブの標的配列を含む DNA 及び / 又は RNA の酵素的増幅を適時実施するため必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び / 又はこれらのプローブと検出すべき微生物の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な標榜液又は該標榜液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

好適寿命が長く、容易に精製及び標識できる。

DNA プローブ技術を使用して微生物を確実に診断するためには、使用されるプローブは高特異性（即ち他の生物に由来する核酸と交叉反応すべきでない）且つ高感度（即ち検出しようとする生物の全株ではないとしてもほとんどの株がプローブと反応すべきである）であるべきである。従って、好適標的配列は以下の特徴を有するべきである。

(1) 配列は該当生物の各株のゲノム中に存在すべきである。

(2) 進化による配列の相違は、一方では該当種を他の密接に関連する種から区別できるようにするために十分な配列相違があり、他方では使用されるプローブで該当種の全株を検出できるようにするために十分な配列保存があるよう構成されるべきである。

種特異的プローブは多数の生物について記載されている。最近の文献では Tenover, Clin. Microbiol. Rev., 1: 82-101, 1988 を参照されたい。

しかしながら、ゲノム中のどの遺伝子から特異的プローブ配列を誘導できるのかについては不明である。プローブ

開発にあたっては、最終的に対象生物に対して特異的になるようなフラグメントを得るために大規模な選択手順に従わなければならないことが多かった(Korolik et al., J. Gen. Microbiol. 134: 531-529, 1988; Grimont et al., J. Clin. Microbiol. 21: 431-437, 1985; Welcher et al., Nucl. Acids Res. 14: 10027-10044, 1986; Donegan et al., Mol. Cell. Probes 3: 13-26, 1989; Beaulieu and Roy, Abstract nr D249, Abstracts of the Annual Meetings of the American Society for Microbiology, 1989)。ほとんどの場合、特異的フラグメントが誘導される遺伝子の構造又は実態は解明されておらず、別の特異的プローブが所望される毎にスクリーニング手順を手探りで繰り返さなければならぬ。上記基準を満たし且つ僅在する遺伝子が数値に固定されるならば、時間と手間のかかる選択が不要にな

る。

16S又は23S rRNA遺伝子は、既に記載されている方法を使用して配列を容易に得ることができ、種特異的検出に使用可能なこれらの高保存性遺伝子内に種々の領域が存在することが知られているので、プローブ開発に利用されている。しかしながら、生物によっては進化による核酸配列保存性が非常に高いため、例えば16S及び23S rRNA遺伝子から高特異性で高密度のプローブを調査できない場合がある。更に、これらの遺伝子の保存性の結果、標的配列のみで1又は少数のミスマッチに基づいて2種の生物を区別しなければならないことが多くなり、ハイブリダイゼーションのストリンジンジャーが必要になる。これらの条件から少しでも外れると、誤認の恐れがある。

従って、16S及び23S rRNA遺伝子から特異的プローブを調査することができなかつた種を含むほとんどの生物に種特異的なプローブを開発することができ、好ましくはより広いストリンジンジャー範囲を有する僅在遺伝子を特異付けることができるならば、非常に有利である。

各細胞生物は、その転写物がリボソームの機能とタンパク質の合成とに不可欠であるため、リボソームRNAシス

トロンを有する。一般に、遺伝子はゲノム中に多重コピー存在する。真正細菌では16S rRNA遺伝子【小サブユニットrRNA(srRNA)と同じ】はrRNAシストロンの5'末端に位置し、23S rRNA【大サブユニットrRNA(lrRNA)と同じ】が後続する。5SrRNA遺伝子はシストロンの3'末端に位置する。16S、23S及び5S遺伝子はスペーサー領域により分離され、これらのスペーサー領域には転写後プロセッシングに関する転写RNA(tRNA)遺伝子及びシグナル配列が位置し得る。まず最初にrRNAシストロンは前駆物質RNA分子として転写される。この一次転写物はエンドリボヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼにより更にプロセッシングされ、成熟産物を生成する。従って、スペーサー領域配列は生物のゲノムの中のみに存在するのではなく、前駆体RNA分子及びプロセッシング産物中にも存在する。真正細菌rRNAシストロンの構造及びプロセッシングは、Gegenheimer and Apirion, Microbiol. Rev. 45: 502-541, 1981に詳細に記載されている。

真核生物の核ゲノム中の状況は多少異なり、srRNA

及びlrRNA間に5.8SrRNA遺伝子が位置しており、5SrRNA遺伝子は別個の長いタンデムアレー中に配置されている(Perry, Annu. Rev. Biochem. 45: 605-629, 1976; Long and Dawid, Annu. Rev. Biochem. 49: 727-764, 1980)。しかしながら、真核生物のミトコンドリア又はクロロプラスト中のrRNAシストロンは実際には核生物である(Borsig and Grivell, Nature 290: 443-444, 1981)。

文献には非常に少數の真核又は原核生物のスペーサー領域の核酸配列しか記載されていない(例えばYourop et al., J. Biol. Chem. 254: 3264-3271, 1979; 及びMartens et al., System. Appl. Microbiol. 2: 224-230, 1987)。これらのデータから核酸配列保存を確實に予想することはできず、従つて、特異的プローブの選択のためのスペーサー領域の適応については全く推定することができない。

より詳細には、真核生物に関して、生物学的サンプル中

で原生物の検出に使用され、16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるハイブリダイゼーションプローブは未だに報告されていない。真核生物の大・小サブユニットrRNA遺伝子間の対応するスペーサー領域についても何ら解明されていない。

真核生物に関する限り、リボソーム遺伝子スペーサーからクローニングされたフラグメントの使用が Leishmaniaに関する分離学的研究に記載されている (Ramirez and Guevara, Mol. Biol. Parasitol. 22: 177-183, 1987)。しかしながら、使用された領域及び研究のアプローチは、特に以下に述べる理由により、小rRNA及び大rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるプローブを使用するために当業者には無益である。

(1) Ramirez及びGuevaraにより使用されたリボソーム遺伝子スペーサーは srRNA 及び lrRNA 間のスペーサー領域ではなく、2つの隣接する rRNA シストロン間に存在する配列であり、このようなスペーサーは真核生物では rRNA シストロンの反復単位間にしか見いだされず、srRNA 及び lrRNA 遺伝子間の内部

スペーサーには無関係である。

(2) 遺伝子スペーサーフラグメントを使用する Leishmania 分類群間の区別は、制限フラグメントパターンを比較することにより得られ、使用されるフラグメントは非特異的である。

従って、サンプル分析を用いて簡単にハイブリダイゼーションプロトコルを使用してフラグメントで区別することは不可能である。

リボソーム遺伝子スペーサー中に高特異的プローブが存在し得るということも立証されていない。

従って、本発明の目的は、細菌種のような特定生物の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域から誘導される種特異的プローブを提供することである。

本発明の別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus

pneumoniae, Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための、16S-23S rRNA スペーサー領域から誘導される DNA プローブを提供することである。

本発明の更に別の目的は、ドットスポット、膜置換、コンベティション、サンドイッチ又は逆ハイブリダイゼーション試験のようなハイブリダイゼーション試験により生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための、16S-23S rRNA 遺伝子スペーサー領域から誘導される DNA プローブを提供することである。本発明の更に別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis

idis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の in vitro 膜質用プローブ及び簡単な診断方法を提供することである。

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特徴的には細菌の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約 15 ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

本発明はより詳細には、非ウイルス生物、特に原核生物、より特徴的には細菌の rRNA 遺伝子間、特に 16S 及び 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の約 15 ヌクレオチド～ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくはスペーサー領域の約 15～約 100 ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

以下の文中で「スペーサー領域」なる用語は、rRNA 遺伝子間、より特徴的には 16S 及び 23S rRNA 遺伝

子間のスペーサー領域を意味する。

本発明は、検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定期には細胞に固有であるように選択された rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを標識する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブに係り、rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の前記配列は、

- \* 目的生物の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近開発の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較し、

\* 最近開発のうちの少なくとも 1 種の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも 1 つのミスマッチを有する目的生物の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約 1.5 ヌクレオチド、好ましくはスペーサー領域の約 1.5 ～ 約 1.0 ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸 (DNA 及び／又は RNA) と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより選択される。

を欠失させ、

\* 少なくとも約 1.5 ヌクレオチド、好ましくは約 1.5 ～ スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約 1.5 ～ 約 1.0 ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸 (DNA 及び／又は RNA) と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより選択される。

本発明は特に、rRNA 遺伝子間のスペーサー領域が 1.6S rRNA 遺伝子及び 2.3S rRNA 遺伝子間の既知スペーサー領域であるようなプローブに係る。

追って概説するように、数種の微生物のスペーサー領域をクローニングし、配列決定及び比較した。比較の結果、スペーサー領域の核酸配列は高保存性の rRNA 遺伝子に比較して半保存性 (semi-conserved nature) であることが判明した。従って、スペーサー領域は rRNA 遺伝子それ自体よりもプローブの開発に好適である。図 1、2 及び 10 は、高度に同源する生物 (例えば同一遺伝種からの高度に同源する株) 間に高度の配列相同意があることを示す。図 3 及び 7 に示すように、並の同源性を有する生物間では多少大きい配列相違が認められた。図 4 ～ 6 に示すように、

同源性の低い種間では顕著な配列相同意は (tRNA 配列を除き) 全くないことが判明した。

下記表では、異なる株の 1.6S rRNA 配列の相同意 (1.6S hom) (配列相同意 %) を、スペーサー領域の対応する相同意 (スペーサー hom) に比較した。相同意 (1.6S hom 及びスペーサー hom) は、Intelli gentics Inc. 及び Genofit SA 製 P C Gene ソフトウェア (1989年4月20日リリース 6.01) を使用して計算した。比較したヌクレオチドの総数を括弧内に示す。この結果から明らかのように、スペーサー領域は 1.6S rRNA 分子よりも低保存性である。

比較株		16S	X% -
株 1	株 2	hom	hom
<u><i>M. gonorrhoeae</i></u>	<u><i>M. gonorrhoeae</i></u>	99.9%	100%
NCTC 8875	ITG 4367	(1434)	(335)
<u><i>B. pertussis</i></u>	<u><i>B. bronchiseptica</i></u>	100%	98.1%
ATCC 10380	NCTC 452	(417)	(582)
<u><i>M. gonorrhoeae</i></u>	<u><i>M. meningitidis</i></u>	99%	93.5%
NCTC 8875	NCTC 10025	(1452)	(803)
<u><i>B. catarrhalis</i></u>	<u><i>M. negligens</i></u>	97.9%	87.1%
ITG 4197	ATCC 19975	(1244)	(498)
<u><i>B. pertussis</i></u>	<u><i>M. gonorrhoeae</i></u>	88.8%	58.4%
ATCC 10380	NCTC 8375	(998)	(582)
<u><i>B. catarrhalis</i></u>	<u><i>M. gonorrhoeae</i></u>	83.8%	68.1%
ITG 4197	NCTC 8375	(1485)	(498)
<u><i>B. ducreyi</i></u>	<u><i>E. coli</i></u>	88.8%	67.1%
CIP 541		(1498)	(846)

この結果、同源する対象病原種 (即ち *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*)

特表平5-504889 (18)

arrhalis. Haemophilus ducreyi. Haemophilus influenzae. Bordetella pertussis. Streptococcus agalactiae. Streptococcus pneumoniae. Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 種) のスペーサー領域配列から種特異性及び感度の高いアローブを誘導することができた。16S 及び / 又は 23S rRNA 分子中で高特異性アローブを見いだすことができなかった Neisseria meningitidis 及び Bordetella pertussis 種のスペーサー領域からも有用なアローブを誘導することができた。本明細書に記載する以外の種(例えば他の Campylobacter 種、他の Haemophilus 種、Actinobacillus 種、Bacteroides 種、Chlamydia 種等)の特異的アローブも同様にスペーサー領域配列から誘導できる。

16S 及び 23S rRNA 遺伝子間の転写スペーサー領域から誘導されるアローブの目的的は、検出すべき細胞中に存在するゲノム DNA 及び前駆体 RNA 分子である。前駆

体 RNA 分子は一本鎖であり、多重コピー存在し得るので、前駆体 RNA 分子を検出すると有利である。他方、DNA 分子は RNA 分子よりも酵素分解を非常に受けにくい。従って、ハイブリダイゼーション前に RNA 分解を生じないように十分に生物学的サンプルを処理及び / 又は保存できない場合には、DNA ターゲッティングが好適である。

16S - 23S rRNA 転写スペーサー領域から誘導されるアローブの別の利点は、ポリメラーゼ錠反応 (PCR) を使用する酵素増幅後に直ちに検出する点にある。多くの微生物のスペーサー領域は例えば、夫々 16S 及び 23S rRNA 遺伝子の 3' 実端及び 5' 実端の保存領域に割り当てられた同一プライマーを使用して酵素的に増幅され得る。rRNA 遺伝子の高保存性を利用すると、同一試験及びプロトコルを使用して好適には同時に多数の生物のスペーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスペーサー領域に特異的にターゲッティングするアローブを使用して増幅フラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントの同時且つ特異的検出のために有利な方法は、逆ハイブリダイゼーションである。

スペーサー領域は保存配列により夾みされているので、

この領域を PCR 技術によりクローニング及び配列決定するのは簡単であり、同一プロトコルを多種の生物に適用することができる。従ってスペーサー領域の配列は、16S 又は 23S rRNA に割り当てられた保存プライマーを使用する rRNA 遺伝子の酵素的増幅により得られる。スペーサー領域を占めるフラグメントの増幅に使用可能な塩基プライマー対の例を以下に挙げる。

プライマー対 1 : TCCCTTCAGAT TCAACCCCTGG CCCC 及び  
CCTTTCCCTC ACCGTAATGG T  
プライマー対 2 : TCCCTCAACT CCTAACAAAGG TA 及び  
CACGTCCCTTC GTCCCCCT.

増幅したフラグメントをそのまま、又は固有制限部位を認識する制限酵素で消化後に 2 つのサブフラグメントとしてクローニングすることができる。M13 で PCR 産物をクローニングするためのストラテジーは、Medlin et al. (Gene 71: 491-499, 1988) に記載されている。

同一ストラテジーを使用してプラスミドベクターでクローニングすることができる。このアプローチによると、塩基プライマーの 5' 実端から固有制限部位を含むヌクレオ

チド配列を伸長させ、フラグメントを順方向にクローニングする。プラスミドベクターにクローニング後、ジオキシチエニンターミネーション法を使用してスペーサー領域を配列決定することができる。

このアプローチはゲノムバンク又は遺伝子庫の制限エンドヌクレアーゼフラグメントを使用する従来のクローニング手順に比較して著しく簡単に時間がかかるない。

クローニングせずに PCR フラグメントで配列決定反応を直接実施すると、より迅速に配列情報が得られるが、クローン化フラグメントから生成された配列情報のはうがより正確且つ完全である。PCR フラグメントに比較して、クローン化遺伝子フラグメントは容易に大量精製できるので、配列決定段階を明確に読み取ることができる。アローブ配列中に 1 つでもミスマッチがあるとアローブは無効になるので、配列を得る際には濃度よりも精度のはうが著しく優先される。

上記に要約したアプローチによりスペーサー配列を得る容易さを考慮すると、アローブが所望される生物のスペーサー領域のヌクレオチド配列を最近開発のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較するのが、特異的アローブ配列

特表平5-504889 (19)

スクリーニングしなくとも良好なプローブ配列を容易に見いだすことができる。

例えば 16S 及び 23S rRNA 遺伝子間の 700 bp のスペーサー領域の場合、tRNA 及びシグナル配列を欠失させることにより得られる「短縮」スペーサー領域は約 500 bp であり得る。

本明細書中に使用する「生物学的サンプル」なる用語は、該当種の配列が検査される臨床サンプル（尿、痰、血液、尿等）、環境サンプル、細胞コロニー、汚染又は純粋培養物、精製核酸等のような試料を意味する。

本明細書中に使用する「rRNA 遺伝子スペーサー領域から誘導」なる用語は、該当プローブが DNA フラグメントから形成されるか RNA フラグメントから形成されるかに関係なく、又はクローニングフラグメント（DNA の場合）から構成されるか又は合成オリゴヌクレオチドから構成されるかに関係なく、該当プローブがゲノム又は転写 RNA 分子中に通常存在するリボソーム RNA 遺伝子間のスペーサー領域に配置された配列とハイブリダイズすることを意味する。

Nelsseria gonorrhoeae 株を検出

を説明するために好適な方法である。

最近開拓とは、DNA 相同の点で最も密接に関連することが知られており且つ該当生物と区別されなければならぬ分類群を意味する。

該当生物の分類学的位置に依存して、最近開拓は該当生物に非常に高度に関連し、結合度が 75% 以上であってもよいし、関連度が低く、有効な DNA 相同百分率を示さなくてよい。初期再生レート法では結合度の値は約 30% 以下であり、固相 DNA : DNA ハイブリダイゼーション法では DNA 相同は更に低く、10 ~ 20% の結合度になる。

一方、該当生物を区別すべき最近開拓のヌクレオチド配列を入手できない場合には、試行錯誤により特異的プローブを選択することができる。その場合、スペーサー領域の任意の場所に位置し得る特異的プローブ領域を各生物毎に実験的に定義しなければならない。tRNA 遺伝子やシグナル配列のようなスペーサー領域の中のほんのわずかの領域しかプローブ領域として先駆的に除外できない場合もある。しかしながら、16S - 23S rRNA スペーサー領域は一概に小さく、通常 900 bp 以下であるので、大規模に

するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

- 様々なグループ：

グループ NCII:

CCATGGCTCG TTATTCTACT TCGC	NCII
CGGAAGTACA ATAACCAACCC ATCG	NCIIIC
CGGAAGUAGA ADAACCAACCC AUCC	NCIICR
CGAUGCCGUCC UUAUUCUACU UCAG	NCIIIR

グループ NCII2:

TTCCTTTAAC TACCCGTTGA CTAAGTAACC AAAC	NCI2
GTTTGCYTAC TTACTCAACC GGTACGTTAA CGAA	NCI2IC
GUUUGCUUAC UUAGCUAAGC CCUACGUAAA CGAA	NCI2ICR
UUCCGUUACU UACCCGUUCA CUAACGUAAA AAAC	NCI2R

から選択される様頃に属しており且つ 15 ~ 選択された様頃の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一の RNA 又は DNA 細胞的とハイブリダイズするという条件下で、

- 各々の末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- 前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換さ

れているか、

・ その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Nelsseria meningitidis 株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

- 様々なグループ：

グループ NMII:

CGTCAACTGT CACCTCCCCC TG	NMII
CACGGGGGAGG TCACACTTGA CC	NMIIIC
CACGGGGGAGG UCACACUUGA CC	NMIIICR
CCUCUAGGUU GACCUUCCCCC UC	NMIIIR

グループ NMII2:

GTTCTTGTC AAGTGTGACC TC	NMII2
CACCTCACAC TTGACCAAGA AC	NMII2IC
CACCUUACAC UUCACCAAGA AC	NMII2ICR
GUUCBUUCCU AACUGUCUAGC UC	NMII2R

グループ NMII3:

GCCTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGCG	NMII3
CCACACTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NMII3IC
CCACAGUAGA UACCUUAAAC GAACGC	NMII3ICR

特表平5-504889 (20)

CCCCUCCUA UACCUAUCUA CUCUGC	NN13R
グループNN14:	
TCCGTTCCAT ATTGCTATCT ACTGTCCA	NN14
TCCACAGTAG ATACCAATAT CGAACCGCA	NN14IC
UGCACACUAG AUACCAAUAU CGAACCGCA	NN14ICR
UCCCCUCCAU AUUCCUAUCU ACUCGCGCA	NN14R
グループNN15:	
TTTCTCTTCCTCAAGCTCAACGTCACGTCGCCCTGAATGGATTCCTGTTCCATT	NN15
AATCCAAACACAATCCATTCAAGCCCCGACCTCACACTTGACCCAAGAACAAAA	NN15IC
AAUGGAAACAGAAUCCAUUCACGGCGACCUCACACUUGACCAAGAACAAAA	NN15ICR
UUUUCUCCUUCGUCAACUGUCGACCUCCGUCAAUUGAUUCUGGUCCAUU	NN15R
グループNN16:	
TTTCCCTAAC ATTCCGTTCA CTACAAACATC AGAC	NN16
CTCTGATCTT CTACTCAACG GAATCTTACG CAAA	NN16IC
CUCUGAUCUU CUACUCAACC CAAGUUAACG CAAA	NN16ICR
UUUCCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUAC AGAC	NN16R

グループBC1:

TTCATGTTTA AACTTGCTTC GTGGA	BC12
TCCACCAACC AACTTTAAAC ATCAA	BC12IC
UCCACCAACC AACGUUAAAAC AUCAA	BC12ICR
UUCAUCUUA AACUUGCCUG GUCCA	BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で。

- ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Haemophilus ducreyi 様を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー核酸グループ：

グループHDII:

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Branhamella catarrhalis 様を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー核酸グループ：

グループBCII:

TTAAACATCT TACCAAC	BCII
CTTTGCTAAC ATGTTTAA	BCIIIC
CUUUCGUAA AUGUUUAA	BCIIICR
UAAAACAUU UACCAAAAC	BCIIR

TTATTATGCC CCACCCATAT TC

HDII

CAATAATGCC CCACCCATAAT AA

HDIIIC

CAAUAUGCCU CCACCCAUUU AA

HDIIICR

UUUUAUUCGC CCACCCAUU UC

HDIIIR

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Haemophilus influenzae 様を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー核酸グループ：

グループHIII:

ACCCATCAA TTGACCCGAC TT

HIII

特表平5-504889 (21)

AAGTGGGTC AATTTGATTC GT

BIIIC

AACGCCGUC AAUGUCAUCC GU

BIIICR

ACCCAUAAA UGACCCCCAC UB

BIIIR

グループBII2:

ACTTTGAAGT GAAAGCTTAA AG

BII2

CTTTAACTTT TCACTTCAA GT

BII2C

CUUUAACUUU UCACUCAAAA GU

BII2CR

ACUUUCAACU GAAAACUAAA AG

BII2R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Bordetella pertussis 1株を検出す

るための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

-核酸グループ:

グループBPII:

CCACACCCAT CCTCTGCACA GCCTT

BPII

AACCCCTCTCC ACACCATCGG TCTCC

BPIIIC

AAGCCUGUCC AGACCAUGGG UGUCC

BPIIICR

CCACACCCAU CCUCGCGACA CCCUU

BPIIIR

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Streptococcus pneumoniae 1株を検出すための本発明のハイブリダイゼーションプローブ

は、

-核酸グループ:

グループSPII:

CTGAGACATC ACCAACTTAAT CCA

SPII

TGCATTACTT CCTGTATCTCT CAC

SPIIIC

UCCAUUACUU CGUGAUCUCU CAC

SPIIICR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAA GCA

SPIIIR

グループSPI2:

AGGAACCTCC CATTCGCTCT

SPI2

AAGACCAATG CCCAGTTCT

SPI2IC

AACACCAAUG CGCACGUCCU

SPI2ICR

AGGAACUCGG CAUUGUCUUV

SPI2R

グループSPI3:

CAGTTTATGA CTGAAACGTC AGAA

SPI3

配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズするという条件下で、

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Streptococcus agalactiae 1株を検出すための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

-核酸グループ:

グループSAII:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T

SAII

AACAATTTCGA ACCCTTCGAT T

SAIIIC

AACAAUUUCA ACCUUUCCAU U

SAIIICR

AAUCCAAAGG UUCAAUUUGU U

SAIIR

グループSAI2:

CGAACCTCC CATTCGCTCT TT

SAI2

AAGACCCAAA TGGCAGGTTT CC

SAI2IC

AACACGCCAA UGGCACGUUU CC	SAI21CR
CGAAACCUCC CAUUGGCCUC UV	SAI2R
グループ SAI3:	
TCCACCATCT AGAAAATAGAT TGTAGAA	SAI3
TTCTACATTC TATTCTCTAGA TCGTCCA	SAI3IC
UUCGACAAUC UAUUUCUAGA UCCUGGA	SAI3ICR
UCCACCAUCB AGAAAUAACAU UGUACAA	SAI3R
グループ SAI4:	
TCTACTTTTA AACAAACTAG CTT	SAI4
AACCTACTTT CTTTAAACT AGA	SAI4IC
AACCUAGUUU CUUAAAACU AGA	SAI4ICR
UCUACUUUUA AACAAACUAG GUU	SAI4R
から選択される核酸に属しており且つ15'～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は	
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標的配列と同一のRNA又はDNA側的とハイブリダイズするという条件下で、	
一・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、	
・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換さ	

C : シチジル残基

G : グアニジル残基

T : チミジル残基

U : ウラシル残基。

「標的」なる用語は、上記に定義したグループNGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4の配列のいずれかに相補的な配列を意味する。

本発明のプローブが上記配列の片側又は両側に核酸端部（例えばクローニングベクターの核酸フラグメント又は該クローニングベクターから前記アロープを切断することにより得られるリンクーフラグメント）を含む場合、このような延長部は、追って定義するような本発明の方法により試験され得る微生物のDNA中で上記標的以外の任意の対応する相補的核酸配列とハイブリダイズしないように選択されるべきである。このようなハイブリダイゼーションは寄生性であり、プローブの特異性を低下させる。好適プローブは、上記グループの配列のいずれかから形成される

れているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

本発明は更に、適切な条件でアロープがCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び/又はRNAと特異的にハイブリダイズするという条件下で、図10に示す16S-23S rRNAスペーサー配列から選択される15'～最大数のヌクレオチドの配列、又はTがUで置換された対応配列、又はその相補配列、又はTがUで置換された対応する相補配列を含むCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのハイブリダイゼーションプローブに係る。

グループNGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4に示した配列中、アルファベットは以下のヌクレオチドを表す。

A : アデニル残基

核酸フラグメントから構成され、該フラグメントは15'～該当核酸配列の最大数のヌクレオチドを含む。

上記ヌクレオチド配列（及び以下に記載する他の配列）において、式の左端は常に該当配列の5'末端に対応し、右端は3'末端に対応する。

更に「グループXのプローブ」（XはNGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BPI1, SPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及びSAI4から選択される）と称するとき、このようなプローブは上記又は下記に定義するグループに属する核酸の1種に含まれる配列を有するものと理解されたい。

また、本明細書中で使用する「ヌクレオチド」なる用語は、特に明記しない限りリボヌクレオチド及びデオキシヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド（例えばイノシン）を無差別に意味するものと理解されたい。「ヌクレオチド」なる用語は更に、修飾基（例えばハイブリダイゼーション能に根本的に影響しない化学的修飾基）を含むヌクレオチドも包含する。このような修飾基の目的は、例えば特に該当

特表平5-504889 (23)

RNA又はDNA鎖（例えば他のDNA及び／又はRNAと共に生物学的サンプル中に最初に含まれているRNA又はDNA鎖）とのハイブリダイゼーション産物中から標識又はラベルされたプローブを後で検出するために適切なマークー又はラベルと置換又は簡便的に結合し易くすることである。

例えば、このような修飾基は、適切な導素又は蛍光又は化学発光ラベルを保持する他の抗体により特異的に認識され得る抗体により認識可能である。可能な標識手順については追って詳細に説明する。

本発明は更に、上記配列のいずれかを有しており且つ上記プローブの特異性を変更しないように一部のヌクレオチドが置換したプローブにも係る。プローブは、上記グループのいずれかに属する核酸の1種又はその一部から構成される場合もあるが、その場合、プローブは Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae としくは Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli の RNA 又は DNA に含まれる配列に相補的な配列（数字のみ又は数字の後に R を記述することにより表す）から形成されるプローブを提供する。

Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の遺伝材料に対する該プローブとの特異性を失えない程度までその両側にヌクレオチド延長部を含む。

従って本発明は、場合によりヌクレオチド配列に少數の些少の変異を有するほとんどの Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae としくは Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli の RNA 又は DNA に含まれる配列のヌクレオチド配列からなるレアリカ（数字の後に IC 又は ICR と記述することにより表す）、又は Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meni-

ngitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae としくは Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli の天然 RNA 又は DNA に含まれる配列に相補的な配列（数字のみ又は数字の後に R を記述することにより表す）から形成されるプローブを提供する。

より詳細には、該当 DNA 中の標的配列は、このような標的に対する本発明のプローブのハイブリダイゼーション特異性に影響ないように、場合により株間に些少な天然の変異を有する Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の全部ではないとしても大部分に存在する以下の連続配列のいずれかから構成される。

Neisseria gonorrhoeae の場合、  
CCCAACTAGA ATAAACGACCC ATCG  
CTTTGCTTAC TTACTCAACC CCTACGGTAA CGAA.

Neisseria meningitidis の場合、  
CAGGGGGAGG TCACACTTGA CC  
GACCTCACAC TTGACCAAGA AC

CCACAGCTAGA TAGCTATAAAC GAAACC  
 TCCACAGTAG ATAGGCAATAT CGAACCCA  
 AATGGAAACACAATCCATTCAAGGGCACCGTCAACACTTGACCAAGAACAAAA  
 CTCTGATCTT CTACTCAACG CAATGTTAGG CAAA.  
Branhamella catarrhalisの場合。  
 CTTTCTTAAC ATGTTTAA  
 TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA.  
Haemophilus ducreyiの場合。  
 CAATATGCCCT CCCCCATAAA AA.  
Bordetella pertussisの場合。  
 AACGCTGTCC ACAGCATGGG TGTCC.  
Haemophilus influenzaeの場合。  
 AACCTGGCTTC AATTTCATCC CT  
 CTTTAAGTTT TCACTTCAAA CT.  
Streptococcus pneumoniaeの場合。  
 TGCAATTCTT CCTGATCTCT CAC  
 AACACCAATG CCCACTTCCT  
 TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC.

Streptococcus agalactiaeの場合。  
 AACAAATTTCGA ACCTTTCCAT T  
 AACACCCAAA TGGCAGCTTT CC  
 TTCTACAAATC TATTCTACA TCGTCCA  
 AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA.

本発明のプローブは、対応するヌクレオチド配列を含むインサートを含む組換プラスミドをクローニングし、必要に応じて適切なヌクレアーゼを使用してクローン化プラスミドから対応するヌクレアーゼ配列を切断し、例えば分子量に従う分画により回収することにより形成され得る。本発明のプローブは、例えば従来のホスホトリエステル法により化学的に合成することもできる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter coli を区別することができる。本発明の方法は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株をサンプル中で直接又は株を培養後に検出する方法に係る。

ハイブリッドが検出された場合、グループNGI 1, NGI 2, NMI 1, NMI 2, NMI 3, NMI 4, NM 15, NM 16, BC 11, BC 12, HD 11, HI 1, HI 2, BP 1, SP 1, SP 2, SP 3, SA 11, SA 12, SA 13 及び SA 14 のプローブのいずれかの使用中に失々 Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae 又は Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出する。

s. Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae及びStreptococcus pneumoniaeによる感染が生物学的サンプル中に存在していたと判断することができる。

本発明の実施形態によると、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA全体及びRNAとハイブリダイズするアローブである。

ハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイゼーション温度、媒体の成分の性質及び濃度、並びに形成されるハイブリッドの洗浄温度等の数個のパラメーターに依存して監視され得る。

ハイブリダイゼーション及び洗浄温度はアローブ（その種類組成、種類及び長さ）に応じて上限を制限され、本発明のアローブの最高ハイブリダイゼーション又は洗浄温度は約30～58°Cである。温度がこれ以上になると、デュアルレクシングはアローブと標的との間に形成されるハイブリッドの解離（又は変性）に競合する。

好適ハイブリダイゼーション媒体は約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH 7.0), 約25mMのリン酸緩衝液pH

7.1, 20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%F1 col I, 0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断定性サケ精子DNAを含有する。

好適洗浄媒体は、約3×SSC, 25mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオンホルムアミドを含有する。他のハイブリダイゼーション又は洗浄媒体も使用できる。

しかしながら、アローブ又は媒体に変更を導入する場合、必要な特異性を得るためにアローブを使用可能な温度は、B. D. HAMES and S. J. HIGGINS, (eds.), *Nucleic acid hybridization. A practical approach*, IRL Press, Oxford, U.K., 1985に記載されているような既知の関係に応じて変更すべきである。

この点では、一般にDNA:DNAハイブリッドはRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドよりも安定性が低いことにも留意すべきである。従って、検出すべきハイブリッドの性質に依存して、特異的検出を実施できるようハイブリダイゼーション条件を適応させるべきである。

本発明に従って、一般にNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法は、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値にハイブリダイゼーション温度を適宜調節することにより実現され得る。このような場合、より厳密な条件で洗浄する必要はない。

本発明の別の実施形態によると、ハイブリダイゼーション温度を必ずしもハイブリダイゼーションが特異的となるような値に調節する必要はなく、特に、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値に対応する温度で洗浄を実施するのであるならば、ハイブリダイゼーションが特異的となるような温度よりも低い温度でハイブリダイゼーションを行ってもよい。

特表平5-504889 (26)

グループNGI 1のプローブでNeisseria gonorrhoeae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNGI 2のプローブでNeisseria gonorrhoeae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI 1のプローブでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI 2のプローブでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI 3のプローブでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI 4のプローブでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約48℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI 5のプローブでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約58℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNMI 6のプローブでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBCI 1のプローブでBranhamella catarrhalis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約30℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBCI 2のプローブでBranhamella catarrhalis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約42℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBPI 1のプローブでBordetella pertussis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHDI 1のプローブでHaemophilus ducreyi株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII 1のプローブでHaemophilus influenzae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII 2のプローブでHaemophilus influenzae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI 1のプローブでStreptococcus agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI 2のプローブでStreptococcus agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施基準によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI 3のアローブでStreptococcus  
u.s. agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI 4のアローブでStreptococcus  
u.s. agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約37℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI 1のアローブでStreptococcus  
u.s. pneumoniae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI 2のアローブでStreptococcus  
u.s. pneumoniae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

-Neisseria gonorrhoeaeに特異的なアローブ、即ちグループNG I 1又はNG I 2のアローブと、

-これらのアローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にBranhamella catarrhalis株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記Branhamella catarrhalisに特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグループBC I 1又はBC I 2のアローブと、

-これらのアローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

グループSPI 3のアローブでStreptococcus  
u.s. pneumoniae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

本発明は更にNeisseria meningitidis株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-Neisseria meningitidisに特異的なアローブ、即ちグループNMI 1, NMI 2, NMI 3, NMI 4, NMI 5又はNMI 6のアローブと、

-これらのアローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にNeisseria gonorrhoeae株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にHaemophilus ducreyi株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、-上記Haemophilus ducreyiに特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグループHD I 1のアローブと、

-これらのアローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にBordetella pertussis株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記Bordetella pertussisに特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグループBP I 1のアローブと、

-これらのアローブとBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリ

特表平5-504889 (28)

リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Haemophilus influenzae influenzae 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記 Haemophilus influenzae influenzae に特異的なプローブから選択された少なくとも 1 種のアロープ、即ちグループ H I I 1 又は H I I 2 のアロープと、

-これらのアロープと Haemophilus influenzae influenzae 株の DNA 及び／又は RNA のみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Streptococcus agalactiae 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記 Streptococcus agalactiae

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記 Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli に特異的なアロープから選択された少なくとも 1 種のアロープと、

-これらのアロープと Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株の DNA 及び／又は RNA のみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のアロープは、核酸アロープを利用するアッセイの特異性を増加するサンドイッチハイブリダイゼーションシステムで使用することができる。核酸アロープに基づくアッセイにおけるサンドイッチハイブリダイゼーションの原理及び使用は既に記載されている（例えば D U N N ら

に特異的なアロープから選択された少なくとも 1 種のアロープ、即ちグループ S A I 1, S A I 2, S A I 3 又は S A I 4 のアロープと、

-これらのアロープと Streptococcus agalactiae 株の DNA 及び／又は RNA のみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に Streptococcus pneumoniae 株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

-上記 Streptococcus pneumoniae に特異的なアロープから選択された少なくとも 1 種のアロープ、即ちグループ S P I 1, S P I 2 又は S P I 3 のアロープと、

-これらのアロープと Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA のみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

n d HASSEL, Cell, 12: 23-36

; 1977; RANKI et al., Gene, 21: 77-85; 1983)、直接ハイブリダイゼーションアッセイは好ましい速度を有するが、サンドイッチハイブリダイゼーションは信号対雑音比が高いという点で有利である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーションは核酸アロープに基づくアッセイの特異性を増加することができる。

適正に設計するならば、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは実際には、同一生物の 2 種の異なる核酸部分を認識する 2 種のアロープを使用する場合、核酸アロープに基づく試験の特異性を最大にすることができる。満足しなければならない唯一の要件は、2 種のアロープの両方が（i）標的生物の同一核酸分子にハイブリダイズし、且つ（ii）同一の非標的生物にハイブリダイズしないことである。

2 種の所与のアロープ I 及び II を使用する場合、サンドイッチハイブリダイゼーションシステムは次のように説明することができる。

アロープ I は生物（C でなく）A 及び B 由来の核酸とハ

ハイブリダイズする。

プローブIIは生物(Bでなく)A及びC由來の核酸とハイブリダイズする。

両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズすることが絶対的に必要であるので、生物A由來の核酸がサンプル中に存在する場合のみに検出可能なシグナルが発生される。プローブの一方が検出すべき生物に特異的である場合には、他方のプローブは第1のプローブよりも同一標的分子にハイブリダイズするのであれば、特異的配列から構成しても非特異的配列から構成してもよい。

本発明のプローブは、同一標的分子にハイブリダイズする別の非特異的又は特異的プローブと矢々組み合わせて *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus aralactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* に特異的であるためのサンディッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が *Neisseria gonorrhoeae* に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブと *Neisseria gonorrhoeae* 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で *Neisseria meningitidis* 株を in vitro 検出す

るためのサンディッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が *Neisseria meningitidis* に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブと *Neisseria meningitidis* 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で *Branhamella catarrhalis* 株を in vitro 検出するためのサンディッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が *Branhamella catarrhalis* に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブと *Branhamella catarrhalis* 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイ

ブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で *Haemophilus ducreyi* 株を in vitro 検出するためのサンディッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が *Haemophilus ducreyi* に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブと *Haemophilus ducreyi* 株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で *Haemophilus influenzae* 株を in vitro 検出するためのサンディッチハイブリダイゼーションアッセイ用

特表平5-504889 (30)

キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Haemophilus influenzae に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Haemophilus influenzae 族のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Bordetella pertussis 族を *in vitro* 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Bordetella pertussis に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Bordetella pertussis 族のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該

緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Streptococcus agalactiae 族を *in vitro* 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Streptococcus agalactiae に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Streptococcus agalactiae 族のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Streptococcus pneumoniae 族を *in vitro* 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Streptococcus pneumoniae に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Streptococcus pneumoniae 族のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Campylobacter jejuni 族を *in vitro* 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Campylobacter jejuni に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Campylobacter jejuni 族のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で Campylobacter coli 族を *in vitro* 検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種が Campylobacter coli に対して特異的である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Campylobacter coli 族のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のアローブは、コンペティションハイブリダイゼーションプロトコルでも使用することができる。

コンペティションハイブリダイゼーションでは、標的分子は特異的アローブとその補体との間に形成されるハイブリッドに結合する。標的数が多いほどアローブと

特表平5-504889 (31)

は種々のレベルに調節することができる。

増幅法又は検出法又はその両方は特異的であり得る。両方が特異的な場合は特異性が最大になるので好適である。このようなPCRを利用する高特異性試験は本発明のプローブを使用して実施され得る。

しかしながら、場合によっては、多様な生物に使用できるように増幅法を標準化するために、特異的検出に結び付けられた本発明の検出アローブを夾叉する保存性プライマーを使用する非特異的増幅法が有利である。

標準化増幅法で使用される増幅プライマーは、スペーサー領域の両端の16S及び23S rRNA遺伝子の保存領域に見いだされる(実施例1参照)。

本発明は更に、検出すべき微生物に特異的な本発明のアローブのいずれかを使用して生物学的サンプルに含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に in vitro 検出するための方法にも係り、該方法によると、好ましくはアローブ領域を夾叉する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する(標的配列を含む)DNA及び/又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のアローブとの特異的ハイブリ

その複体との間に形成されるハイブリッドの量は少なくなる。特異的標的が存在していたことを示す陽性シグナルは、標的を加えなかったシステムに比較してハイブリダイゼーション反応が低いことにより確認される。特定の実施形態によると、適切に配置した特異的オリゴヌクレオチドアローブを標的分子とハイブリダイズさせる。次に、混合物を受容器(例えばマイクロタイター皿のウェル)に移し、特異的アローブに相補的なオリゴヌクレオチドを固定し、ハイブリダイゼーションを続ける。洗浄後、相補的オリゴヌクレオチドとアローブとの間に形成されたハイブリッドを、使用したラベルに応じて好ましくは定量的に測定する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、酵素的に増幅した特異的フラグメントを生成するためにポリメラーゼ鎖反応技術(PCR; Mullis and Faloona, Methods in Enzymology 155: 335-350, 1987)で増幅プライマーとして及び/又は夾叉オリゴヌクレオチドプライマー間で増幅されたフラグメントを検出するためのアローブとして使用することができる。

PCRによるハイブリダイゼーションアッセイの特異性

ハイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドアローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出する。

増幅が必要な場合、その目的は標的配列を増幅し(それによって標的配列の夾叉領域も増幅させ)、増幅領域のみを標識することである。

生物学的サンプル中に十分な標的配列が存在する場合、増幅は不要である。

このような場合、ハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段により又は特異的染料の添加により標識を実施すべきであり、生物学的サンプル中に存在するDNA及び/又はRNA全体を標識することに留意すべきである。

本発明は更に、生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に in vitro 検出するためのキットに係り、該キットは、

-検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした本発明のアローブの少なくとも1種と、  
-該アローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの

酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのアローブと  
検出すべき微生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイ  
ブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液  
又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

上記方法及びキットは、Saiki et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6230-6234, 1989)により記載されている逆ドットプロットアッセイのような逆ハイブリダイゼーションドットプロットアッセイを含む。

この場合、5'ビオチニル化プライマーを用いるPCRを使用して標的配列をまず酵素的に増幅する。第2段階では、固体支持体に固定した特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション後、増幅産物を検出する。この方法は実施例2に記載する変形方法のような数種の変形が考えられる。例えば、この方法はスペーサー領域を夾叉する普遍的プライマーを用いるPCR、及び該当生物の種々の特異的オリゴヌクレオチドプライマーをドットスポットし

特表平5-504889 (32)

スペーサー領域自体に配置されたプライマーも使用することができ、PCRは1組のプライマー用いて又は同一反応容器で種々の組のプライマーを用いて実施することができる。

増幅段階なしに逆ハイブリダイゼーションを実施することもできる。この場合、サンプル中に存在する核酸をハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段又は特異的染料の添加により特異的又は非特異的に保護又は修飾すべきである。

ほとんどの場合、スペーサー領域から読み取れ得る該当生物の特異的プローブの数は、本明細書に記載するアロープに制限されない。

生物によっては、種々の細菌の高特異性且つ高感度のアロープの開発のためにスペーサー領域を利用できることができていているアロープは1又は2種しか記載されていない。Bordetella pertussisのみが例外であり、スペーサー領域の唯一の特定領域 (Bordetella pertussis 配列中のヌクレオチド271～299、図2の上段) が特異的配列を有する。しかしながら、Bordetella pertussis の

た菌とのハイブリダイゼーション後に特定の臨床サンプル中に存在し得る種々の微生物の同時に且つ特異的検出に特に有利であり得る。上記のような逆ハイブリダイゼーションアッセイで使用可能な特異的オリゴヌクレオチドプライマーの有利なパネルの例を以下に挙げる。

(i) 咽バネル：Moraxella (Brachyspirilla) catarrhalis

Streptococcus pneumoniae

Haemophilus influenzae

(ii) C S F - バネル：Neisseria meningitidis

Haemophilus influenzae

Streptococcus pneumoniae

(iii) 原生細胞バネル：Neisseria gonorrhoeae

Haemophilus ducreyi

Chlamydia trachomatis

Treponema pallidum

当然のことながら、これらのバネルは他の臨床的に関連する微生物のアロープを加えることにより拡張することができる。歯周ポケットからのサンプル又は血液サンプルのような他の臨床サンプルのバネルも利用できる。

PCRには、非普遍的に保存されたプライマー、例えば

スペーサー領域配列から、高度に関連するBordetella 領域の同時検出に有用であり得るアロープを設計することができる。Bordetella pertussis 以外のBordetella 領域を検出するアロープも図2の配列から推定することができる。同様に、Moraxella nonliquefaciens 及び Haemophilus influenzae バイオグルーパegyptius の潜在的に特異的なアロープも先々図7及び8に示すスペーサー配列から推定することができる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria gonorrhoeae 種を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

- 固体支持体に固定された Neisseria gonorrhoeae に特異的な本発明のアロープのいずれかから選択された少なくとも1種のアロープと、

- 该アロープの既約配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び/又は前記アロープと Neisseria gonorrhoeae 種のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria meningitidis 種を *in vitro* 検出するためのキットに係り、該キットは、

- 固体支持体に固定された Neisseria meningitidis に特異的な本発明のアロープのいずれか

特表平5-504889 (33)

から選択された少なくとも1種のプローブと、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの  
酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。  
本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、  
-固体支持体に固定されたHaemophilus ducreyiに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又

はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。  
本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、  
-固体支持体に固定されたBranhamella catarrhalisに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBordetella pertussis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、  
-固体支持体に固定されたBordetella pertussisに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。  
本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、  
-固体支持体に固定されたHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、  
-固体支持体に固定されたStreptococcus pneumoniaeに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

特表平5-504889 (34)

A及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定されたStreptococcus agalactiaeに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと及びCampylobacter coliに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び／又は前記プローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

-固体支持体に固定されたCampylobacter jejuniに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと及びCampylobacter coliに特異的な本発明のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び／又は前記プローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができる緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

アーロープの使用条件

本発明のプローブは標識すると有利である。任意の從来

のラベルを使用することができる。アーロープは、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H及び<sup>14</sup>Cのような放射性トレーサーにより標識され得る。

放射性標識は、（標識すべき末端に応じて）放射性標識ヌクレオチド、（ホスファターゼによる脱リン酸化を伴うか又は伴わない）ボリヌクレオチドキナーゼ、末端転移酵素又はリガーゼを使用することにより、3'又は5'位の末端標識のような任意の從来方法に従って実施され得る。本発明のアーロープの1種は、數種の放射性ヌクレオチド又は数種の放射性及び非放射性ヌクレオチドから構成される量の合成用マトリックスであり得る。

本発明のアーロープは、1又は数種の放射性ヌクレオチドを使用する化学的合成により製造することもできる。別の放射性標識方法は本発明のアーロープの化学的ヨウ素化であり、アーロープに数個の<sup>125</sup>I原子を結合させる。

本発明のアーロープの1種が非放射性RNA又はDNAとのハイブリダイゼーションに使用するように放射性標識される場合、ハイブリダイゼーションの検出方法は、使用される放射性トレーサーに依存する。一般に、放射性トレーサーにより発生される電離性放射線を検出することが可能

なオートラジオグラフィー、液体シンチレーション、アーティスト又は他の任意の從来方法を使用することができる。

免疫特性（例えば抗原又はハーフテン）、ある種の試薬に対する特異的親和性（例えばリガンド）、検出可能な酵素反応を提供する特性（例えば酵素、補酵素、酵素基質又は酵素反応に関与する基質）、又は物理的特性（例えば任意の波長の光の蛍光、発光又は吸収）を有する基質に本発明のアーロープを組み合わせることにより非放射性標識を使用することもできる。アーロープと標的とにより形成されるハイブリッドを特異的に検出する抗体も使用できる。

本発明のアーロープを化学的に合成する場合には非放射性ラベルを使用することができ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン及びウラシル残基は、アーロープ又はアーロープと相補的DNAもしくはRNAフラグメントとの間に形成されたハイブリッドを検出することができる他の化学的残基に結合し得る。

一方、1種以上のヌクレオチドを他の化学的残基に結合することにより修飾した場合、アーロープのヌクレオチド配列は本発明のアーロープの1種のヌクレオチド配列と同一である。

特表平5-504889 (35)

本発明は更に、上記のように標識され且つ検出可能な本発明のプローブを使用してハイブリダイゼーションによりRNA及び／又はDNAを検出するための方法にも係る。この点では、従来のハイブリダイゼーション方法を使用することができる。

生存生物起源の細胞又はそれ自体生存生物である細胞を検出するためには、化学的又は物理的方法を使用して細胞の部分的又は全溶解によりこれらの細胞のRNA及び／又はDNAに必要に応じてアクセスできるようにし、検出可能な本発明の1又は数種のプローブと接触させる。この接触は、液体媒体又は溶液中でニトロセルロース、セルロース又はナイロンフィルターのような適当な支持体上で実施され得る。この接触は、次々、最適又は制限条件（即ち配列が所定の分子量で完全に相同である場合のみにハイブリッド形成可能な条件）下で実施され得る。このような条件は、温度、反応物質濃度、最適核酸対合温度を低下させる物質の存在（例えばホルムアミド、ジメチルスルホキシド及び尿素）、及び反応容量を外見上低下させるか及び／又はハイブリッド形成を促進する物質の存在（例えばデキストラン硫酸、ポリエチレングリコール又はフェノール）を含む。

一般に、異種DNAの存在が該当用途でプローブの特異性を損なわないならば、クローニングを可能にする組換DNA中に本発明の種々のプローブを含むこともできる。

（以下余白）

ハイブリダイズしなかった本発明のプローブを除去するには、適切なイオン力値及び適切な温度の緩衝液で洗浄し、場合により、S1タクレアーゼ又は一本鎖DNAもしくはRNAを消化するが、DNA-RNAハイブリッドもしくは二本鎖DNAを消化しない他の任意の酵素で処理する。

液体媒体中で、細胞DNA又はRNAフラグメントに對合した本発明のプローブのハイブリッドは種々の方法、例えばヒドロキシアバタイト上のクロマトグラフィーにより液体媒体の残余から分離することもできる。

次に、ハイブリダイズしたプローブをプローブ上のラベルにより検出する。

染色体DNAフラグメントを標的にするためには、RNAを1又は数種の酵素で処理し、DNAフラグメントを変性（即ち両端を分離）した後、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプローブの1種をDNAフラグメントと接触させ、ハイブリダイゼーションの終了に達するため必要な時間後、ハイブリダイズしなかったフラグメントをハイブリダイズしたフラグメントから分離し、細胞検出について上述したようにラベルを検出する。

図1～図10には、種々の微生物中で発見されたスペーサー領域のアライメント（全部または一部を配列したもの）が例として示されている。対(stretch)及び空所(gap)は各々、"："及び"-"で表されている。総ての配列に関して、非コードストランドは、その5'-3'配列で示されている。

5'末端は、16S rRNA遺伝子の近位であり、3'末端は、23S rRNA遺伝子の近位である。

図1～図10に参照される各生体(*E. coli*)の1種を除く)の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の各核酸配列は、新規であることは指摘されねばならない。

図1には、*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8875(上列)及びITM 4367(下列)の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の16S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

図2には、*Bordetella pertussis* ATCC 10380(上列)及び*Bordetella bronchiseptica* NCTC 452(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図3には、*Neisseria meningitidis* NCTC 10025(上列)及び*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8875(下列)の16Sと23S

特表平5-504889 (36)

rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図4には、Neisseria gonorrhoeae NCTC 8375(上列)及びBordetella pertussis ATCC 10880(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図5には、Brachamella catarrhalis ITM 4197(上列)及びNeisseria gonorrhoeae NCTC 8375(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図6には、Haemophilus ducreyi CIP 542(上列)及びEscherichia coli(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図7には、Brachamella catarrhalis ITM 4197(上列)及びMoraxella nonliquefaciens ATCC 19875(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図8には、Haemophilus influenzae(バイオグループ influenzae)NCTC 8143(上列)及びHaemophilus influenzae(バイオグループ egyptius)ITM 859(下列)の16Sと23S

rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図9には、Streptococcus pneumoniae S90-5122(上列)及びStreptococcus agalactiae U90-2817(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図10には、Campylobacter jejuni ATCC 33560(上列)及びCampylobacter coli ATCC 33559(下列)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の23S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

使用した株は、各々培地コレクション：

ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

CIP : Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France.

ITM : Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

NCTC : National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom.

から入手し得る。

以下の実施例は、本発明のプローブの製造法及び種々のハイブリダイゼーションプロトコルを使用するプローブの

特異性及び感度に関する実験結果に関する。臨床に適当な以下の生体：Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Brachamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae及びBordetella pertussisを選択した。

実施例は、種・特異性で感度の高いプローブが、研究した全ての生体のスペーサー領域に容易に知見されたことを示している。さらに、種・特異性で感度の高いプローブが16S及び/または23S rRNA分子に知見されない生体のこの領域からアローブが検出されることを示している。使用した方法は、他に記載しない限り、ROSSAUらのJ.Gen. Microbiol., 135: 1735-1745, 1989または歐州特許出願第8940/045.3に記載の方法と本質的に同一である。rRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法及び逆ハイブリダイゼーションを除く全ての方法は現在当業者に公知である。16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるrRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法は、Perkin Elmer Cetusの"Gene Amp"キットに推薦される方法に従って実施したポリメラーゼ鎖反応法(PCR)により得られた。rRNA分子中に保存されたまたは半分保存された(semi-conserved)領域に対応するスクレオチ

ドをPCRアプライマーとして使用した。逆ドット・プロット法の原理及びプロトコルは、Seikiら(1989)により記載されている。

#### 実施例1

Neisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeaeの両方は、各々皰膜炎及び淋病に関連する重要なヒト病原体である。これらの生体は非常に密接に関連しており、互い及び他のNeisseria種との差別化は間違い易い。Neisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeaeに特異的なDNAプローブは、両方のNeisseria種の間の正しい差別化を進め且つ臨床サンプル中でこれらの種を直接検出するために使用し得る。

Neisseria gonorrhoeaeを検出するために多くのDNAプローブについて記載してきた(歐州特許出願第0272 009号及び同第0337 898号; URDEAら, Clin.Chem.35:1571-1575, 1989; TOTTENら, J.Infect.Dis.148: 462-471, 1989; DOD EGANら, Mol.Cell.Probes 3: 13-26, 1989; KOLBERGら, Mol.Cell.Probes 3: 59-72, 1989)。しかしながら、これらのプローブの内の幾つかは、非-Neisseria gonorrhoeae株と交叉するか、感度が高くないことが知見された。これ

らのプローブは既て 18S-23S rRNAスペーサー領域由来ではなかった。

Neisseria meningitidis株を検出するDNAプローブも報告された(KOLBERGら, Mol.Cell. Probes 3: 59-72, 1989)。Neisseria gonorrhoeaeのビリン遺伝子から誘導されたこのプローブも、Neisseria meningitidisに関して非常に特異性でもなく感度も高くなかった。

Neisseria gonorrhoeae及びNeisseria meningitidis型株の18Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列を、スペーサー領域を広げるPCRフラグメント由来のクローニングした物質を使用して決定した。図3に示されている両方の列から、幾つかの潜在的なプローブ配列が明らかになった。

約60塩基対の予想外の挿入配列を、Neisseria meningitidis株のスペーサー領域中に検出した。以下の配列:

GCTCAAGTCT	GACCTCCCCC	TG	NM11
GTTCCTGGTC	AAGTGTGACC	TC	NM12

を有するオリゴヌクレオチドを、この挿入した配列から精製した。

(図3のNeisseria meningitidis配列の塩基対365~386

v/v), ポリビニルピロリドン(0.02%, v/v)及びシェアをかけて実性したサケ精液DNA(0.1mg/ml)であるか、または5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム,pH7.0)を使用し且つホルムアミドを20% (v/v)まで添加した以外には、非放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、3×SSC, 20%ホルムアミド及び25mM リン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。

ハイブリダイゼーションの結果は、以下の表にまとめられている。各プローブ毎のハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、括弧内に示されている。試験した全てのプローブは、Neisseria gonorrhoeae(プローブNG11)またはNeisseria meningitidis(プローブNM11, NM12及びNM13)に対し非常に特異性で且つ感度が高かったことが証明された。

### 特表平5-504889 (37)

由来の)スペーサー領域のもう1つのエリアで6.Neisseria meningitidisとNeisseria gonorrhoeaeとの間でかなりの度合いで高い違いが明らかになった。このエリアから、2種類のオリゴヌクレオチドプローブ(Neisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeaeの検出用のNM13及びNG11)

```
CGCTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC NM13
CGATCCGTCG TTATTCTACT TCCC NG11
```

が化学的に合成された。

これらのヌクレオチドを、ボリヌクレオチドキナーゼを使用してその5'末端を<sup>32</sup>Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してその3'末端でジゴキシグニン化したUTPと結合して、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、種々の位置由来の多くのNeisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeae株由来のドット-スポットした変性ゲノムDNA及び他の細菌(bacterial taxa)由来の幾つかの株を使用した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC, 25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, v/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%,

分類	陽性株数/試験株数			
	NM11 (45°C)	NM12 (45°C)	NM13 (40°C)	NG11 (50°C)
<u>Neisseria meningitidis</u>	52/52	10/11	56/56	0/11
<u>Neisseria</u> sp ATCC 43631	1/1	1/1	1/1	0/1
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	0/16	0/9	0/10	10/10
<u>Neisseria polysaccharica</u>	0/3	-	0/3	0/3
<u>Neisseria lactamica</u>	0/10	-	0/10	0/10
<u>Neisseria cinerea</u>	0/4	-	0/4	2/4
<u>Neisseria mucosa</u>	0/3	-	0/3	0/3
<u>Neisseria zoocaccae</u>	0/3	-	0/3	0/3
<u>Neisseria flavescens</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria rubislawii</u>	0/2	-	0/2	0/2
<u>Neisseria sicca</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria elongata</u>	0/2	-	0/2	0/2
<u>Neisseria canis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria animalis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria denitrificans</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Neisseria</u> sp	0/5	-	0/4	0/3
CDC group M-3	0/1	-	0/1	0/1
CDC group EF-4a	0/1	-	0/1	0/1
<u>Kinella denitrificans</u>	0/2	-	0/1	0/1
<u>Kinella kongae</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella muelleri</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella crassa</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Simonsiella stedae</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Alveiella gliformis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Eikenella corrodens</u>	0/2	-	0/2	0/2
<u>Chromobacterium violaceum</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Iodobacter fluvialis</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Aquaspirillum dispersum</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Comamonas testosteroni</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Hemophilus influenzae</u>	0/1	-	0/1	-
<u>Hemophilus ducreyi</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Kinella indologenae</u>	0/1	-	0/1	0/1
<u>Moraxella lacunata</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella nonliquefaciens</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella catarrhalis</u>	0/3	-	0/2	0/2
<u>Moraxella cuniculi</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella caniae</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella ovis</u>	0/1	-	-	-
<u>Moraxella galloensis</u>	0/1	-	-	-
<u>Escherichia coli</u>	0/1	0/1	0/1	0/1

NM13 及び NG13 で検出する特異性を、16S rRNA遺伝子の3'末端及び23S rRNA遺伝子の5'末端に各々配置している以下の増幅プライマー：

TGGCTGAAGTCGTAAACAGGTA	AP18
CAC GTC CTTCCCTGCCCT	AP23

とのスペーサー領域の酵素的増幅後においてもチェックした。Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus ducreyi, Bordetella pertussis及びBranhamella catarrhalisの株由来のゲノムDNAの100ナノグラムをPCR反応に使用した。増幅後、収量の1/10をアガロースゲルに接着し、電気泳動させ、ナイロン膜上にプロトした。

統いてこの膜をプローブ NG11 及び NM13 でハイブリダイズした。

各々 NG11 または NM13 をプローブとして使用したとき、Neisseria gonorrhoeaeまたは Neisseria meningitidis 特異が存在するレーンだけにはっきりしたハイブリダイゼーションシグナルが検出できた。

#### 実験例 2

Bordetella pertussisは、百日咳の原因となる因子であ

Bordetella pertussisの検出用プローブは、文献(PARKら, FEMS Microbiol. Lett. 52:19-24, 1988; McPHEAT及びMcALLY, J. Gen. Microbiol. 133:323-330, 1987及びFEMS Microbiol. Lett. 41:357-360, 1987; McLAFFERTYら, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology C-168, 1986及びC-322, 1987)に記載されている。 McLAFFERTYら(1988及び1987)に記載のプローブは、特異性が高くない。記載の他のプローブに関しては、示されたデータは特異性及び感度の度合いを推論するには不十分である。

以下の株のリボソームRNA遺伝子の一部を酵素的に増幅し、プラスミドベクター：Bordetella pertussis ATCC 10380, Bordetella parapertussis NCTC 5952(型株)及びBordetella bronchiseptica NCTC 452(型株)にクローニングした。種々の種類のクローニングしたフラグメントを、ジオキシ基停止法を使用して一部配列し、その配列を比較した。16S rRNA遺伝子に拘わる配列情報は、種-特異性プローブが与えられないことを示している(ROSSAUら, 未発表)。しかしながら図2のアライメントに示されたように、相間でないエリア(271塩基対～約300)がBordetella pertussis

#### 持表平5-504889 (38)

る。再度の予防接種キャンペーンにより、この病気は先進国では殆ど問題ではない。しかしながら第3世界の国々においては、Bordetella pertussisは、幼児の致死率のトップである。

3種類のBordetella属(Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica)の株は、非常に関連しているので(KLOOSら, Int.J.Syst.Bacteriol. 31:173-176, 1981; DE LEYら, Int.J.Syst.Bacteriol. 38: 405-414, 1988)、ひとつの遺伝子型に属するものとして考えるべきである。この遺伝子型の関係は、これらの細菌の他の多くの特徴にも反映するので、その表現型の差別化が冗長となる。

百日咳の臨床兆候はたいてい非定型であり、検査室診断が必要である。感度が高く、特異的で迅速な試験はまだ無い。各地には選択方法が残っているが、回収率は低く且つ結果は通常、接種後3～7日しか有効でない(FRIEDMAN, Clin. Microbiol. Rev. 4:385-370, 1988; HALPERINら, J. Clin. Microbiol. 27:752-757, 1989)。DNAプローブベースの分析は、Bordetella pertussis感染の診断を非常に改良し得る。

及びBordetella bronchiseptica株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域に知見された。

Bordetella parapertussis株のスペーサー領域の配列は、Bordetella bronchiseptica配列と大体同一である(ROSSAUら, 未発表)。

Bordetella pertussisのスペーサー領域のヌクレオチド271と295との間のエリアから、以下の配列：

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT BPII

を有するオリゴヌクレオチドプローブを購入した。

オリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、ターミナルトランスフェラーゼを使用してジゴキシゲニン-UTPでラベルした。ターゲットとしてドット-スポットし、変性したゲノムDNAで擇られた結果を以下の表にまとめた。

特表平5-504889 (39)

分類	55°Cに於けるBP11とのハイブリダイゼーション 陽性株数/試験株数
<i>Bordetella pertussis</i>	4/4
<i>Bordetella parapertussis</i>	0/3
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0/3
<i>Alealigenes dentriticans</i>	0/1
<i>Alealigenes paradoxus</i>	0/1
<i>Oligella ureolyticus</i>	0/1
<i>Oligella urethralis</i>	0/1
<i>Taylorella equigenitalis</i>	0/1
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0/1
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	0/1
<i>Cronobacter laevosterceri</i>	0/1
<i>Neisseria meningitidis</i>	0/1
<i>Branhamella catarrhalis</i>	0/1
<i>Nerophilus influenzae</i>	0/1

使用条件下において、プローブBP11は *Bordetella pertussis*に対し100%特異性で且つ100%の感度であることを証明した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC:0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したことにおいて、非放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のアロトコルシートに記載のものと同じであった。洗浄液は3×SSC, 20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は55°Cであった。

逆ドット・プロット分析を利用すると、上記表に示されているのと本質的に同一結果が得られた。この分析は以下のように実施した：

異なる細菌種から得られた種々の株からの細胞DNA 1 μgを、ジオキシゲニン-11-dUTP(Boehringer Mannheim)を増幅混合物に添加して最終濃度40 μMとした以外には、GeneAmpキット(Perkin Elmer Cetus)の製造業者により操作されるように酵素的に増幅した。プライマーAP16及びAP23(実施例1参照)を用いて全部で50μlで30サイクル(1分/95°C, 1分/50°C, 1分/72°C)実施し、その後各PCR混合物の5μlを膜の存在下にハイブリダイゼーション混合物(上記定義通りの組成物)1 μlに添加し、これにプローブBP11の0.2 pmol, 0.02pmol及び0.002pmolを固定した。ハイブリダイゼーションを55°Cで1時間実施した。洗浄工程を同一温度で10分間実施した。非放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)に記載の如く検出した。ダル電気泳動及び逆ドット・プロットアロトコルを使用する臭化エチジウム染色後に実施した全サンプル中にはっきりしたバンドを検出したが、もっぱら *Bordetella pertussis* DNAが存在するサンプルにはっきりした陽性シグナルを得

られた。

#### 実施例3

*Moraxella catarrhalis*または*Neisseria catarrhalis*とも知られる *Branhamella catarrhalis*は、特殊培養基を必要とする生化学的に不活性な細菌である。近年、その重要な病原体としての潜在能力が認識された。

*Branhamella catarrhalis*は、重い気道感染症によく含まれる(HAGERら, Rev.Infect.Dis.9:1140-1149,1987)。*Branhamella catarrhalis*の診断には、特殊培養基を必要としない微生物による異常増殖により阻止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共通生物(例えば、*Neisseria*種など)とを区別するための一組の表現型試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来の *Branhamella catarrhalis*を差別化する試験は実られているので、表現型試験は、検定上の *Branhamella catarrhalis*単離物の識別に関しては決定的ではない(RIOU及びGUILBOURDENCHE, Drugs 31[補遺, 3]: 1-6, 1986)。分析に基づいたDNAプローブを使用すると、*Branhamella catarrhalis*の検査富診断をかなり簡素化できる。未特定期DNAフラグメントから構成し、*Neisseria*

in cavia由來のDNAで文書ハイブリダイズした *Branhamella catarrhalis*用のDNAプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている(Abstracts of the Annual Meeting of the Americas Society for Microbiology, Abstract No.D-248, 1989)。

*Branhamella catarrhalis* ITG 4187のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ链反応法により酵素的に増幅させ、アラスミドベクターにクローニングした。続いて18S-23S rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキシ糖停止法により配列した。この配列は図7に示されている(上界)。

配列データより、以下のオリゴヌクレオチド:

TATCACAAAGC AACCTTCCTA ACTTCTGT BCII

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末端でポリヌクレオチドキナーゼで<sup>32</sup>Pラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の31 *Branhamella catarrhalis*株及び他の細菌分類の19株のドット・スポットした、変性グノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション・混合物は、3×SSC(1×SSC:0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0), 25mM

特表平5-504889 (40)

<u>Eikenella corrodens</u>	NCTC 10598
<u>Xanthomonas maltophilia</u>	LNC 958
<u>Xanthomonas campestris</u>	LNC 568

であった。

実験例4

歯性下疳の原因となる Haemophilus ducreyi は、特異培養基を必要とするグラム陰性細菌である。この生体の培地は困難で且つ感度が無いが、依然として、 Haemophilus ducreyi 感染の診断のための選択方法である。特異性の高いプローブを使用すると、培地が不要で且つ診断の感度が強くなる。他の Haemophilus 及び Pasteurella 種と弱い交叉反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をターゲットとする Haemophilus ducreyi 用のクローニングしたDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている (J.Clin.Microbiol. 27:1441-1445, 1989)。

Haemophilus ducreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一部をポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅し、アラスミドベクターにクローニング化した。

18Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列は、ジデオキシ酸停止法により得られた。核酸配列より、以下のオリゴヌクレオチド:

リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%v/v)、Ficoll(0.02%,v/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%,v/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%,v/v)及びシェアをかけた変性したサケ精液DNA(0.1mg ml<sup>-1</sup>)であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸カリウム緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、30°Cであった。

使用条件下で、プローブBCIIを既ての Branhamella catarrhalis 株にハイブリダイズした。他の細菌種に属する試験した株は全て、このプローブに対し強いハイブリダイゼーションシグナルを与えた。

試験した非-Branhamella catarrhalis 株は:

<u>Moraxella lacunata</u>	ATCC 17967
<u>Moraxella lacunata</u>	ATCC 17952
<u>Moraxella bovis</u>	ITM 1801
<u>Moraxella nonliquefaciens</u>	ATCC 19975
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	ITM 3388
<u>Neisseria ovis</u>	NCTC 11227
<u>Neisseria canis</u>	ATCC 14859
<u>Alysseilla sp.</u>	ATCC 29468
<u>Moraxella osloensis</u>	LNC 1043
<u>Moraxella osloensis</u>	ATCC 17974
" <u>Moraxella parapheophyllopyruvica</u> "	LNC 5125
" <u>Moraxella canis</u> "	LNC 7022
<u>Psychrobacter immobilis</u>	LNC 6784
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	ATCC 23005
<u>Escherichia coli</u>	B
<u>Haemophilus influenzae</u>	NCTC 8143

CACCCTTTAA TCCGAAGATA TTACG HDII

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で<sup>32</sup>Pラベルするか、またはターミナルトランスクレオチダーゼを使用してジオキシン化UTPとその3'末端を結合し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

ターゲットとして、種々の位置からの41 Haemophilus ducreyi 株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ドット-スポットした変性したゲノムDNAを使用した。既ての Haemophilus ducreyi 株にもっぱらハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したことを除いて、3×SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, v/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%, v/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%, v/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA(0.1mg ml<sup>-1</sup>)または、非-放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートの溶液であつ

た。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸カリウム緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、40°Cであった。

試験した非-Haemophilus ducreyi 株は:

<u>Escherichia coli</u> MC 1061
<u>Escherichia coli</u> B
<u>Actinobacillus actinomycetemcomitans</u> NCTC 9710
<u>Actinobacillus lignieresii</u> NCTC 4189
<u>Haemophilus aphrophilus</u> NCTC 5906
<u>Haemophilus influenzae</u> NCTC 8143
<u>Bistaphilus ovina</u> BIM 896-7
<u>Pasteurella multocida</u> NCTC 10822
<u>Branhamella catarrhalis</u> ITM 4187
<u>Comamonas testosteroni</u> ATCC 17407
<u>Oligella urethralis</u> LNC 6227
<u>Neisseria gonorrhoeae</u> ITM 4437
<u>Campylobacter jejuni</u> CCUG 11284
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u> ATCC 23055
未標別株 ITM 3585

であった。

実験例5

グラム陰性細菌種 Haemophilus influenzae は、2種類のバイオグループ: influenzae 及び aegyptius に分類することができる (Casimir, Ann.Inst.Pasteur/Microbiol. 1978; 155-163, 1988). influenzae バイオグループの生体は、重要な呼吸器道の病原体であり、子供の扁桃炎及び耳炎の原因でもある。バイオグループ aegyptius 単離物は、重い

気候では、細胞型結膜炎の原因として作用する因子であり、  
ブラジル紫斑熱と関連しているらしい(Brennerら, J.Clin.  
Microbiol., 28: 1524-1534, 1988)。分離可能な及び非-分  
離可能な *Haemophilus influenzae* は、核酸プローブにより  
迅速に検出され得る。

この種のDNAプローブは、文献に記載されている(Terpstraら, *Scand.J.Infect.Dis.* 19:641-646, 1987; Malovinら, *J.Clin.Microbiol.* 26: 2132-2138, 1988)。これらのプローブは16S-22S rRNAスペーサー領域から調導されているものではない。

Haemophilus influenzae NCTC B143型株のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ鍊反応により酵素的に増幅させ、次いでプラスミドベクターにクローン化した。

16Sと22S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列が  
ジデオキシ酸停止方法により得られた。核酸配列から、以  
下のオリゴヌクレオチド:

ACGGATCAAA TTGACCCGAC TT BII 1  
ACTTTCAACT CAAAACCTAA AC BII 2

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で<sup>32</sup>Pラベルし、ハイ

分類単位	アローブ HII1(50°C)	アローブ HII2(30°C)
<u>Haemophilus influenzae</u> (H175-7 influenzae) NCTC 8143	+	+
<u>Haemophilus influenzae</u> (H175-7 influenzae) ITM 3837	+	+
<u>Haemophilus influenzae</u> (H175-7 arthropilis) ITM 859	-	+
<u>Haemophilus parahaemolyticus</u> ITM 402	-	-
<u>Haemophilus parainfluenzae</u> ITM 1094	-	-
<u>Haemophilus sphrophilus</u> NCTC 5506	-	-
<u>Haemophilus ducreyi</u> CIP 542	-	-
<u>Pasteurella multocida</u> NCTC 10322	-	-
<u>Pasteurella avicola</u> ATCC 17911	-	-
<u>Actinobacillus lignieresii</u> NCTC 4189	-	-
<u>Actinobacillus actinomycetemcomitans</u> NCTC 9710	-	-
<u>Bistobolus ovis</u> NIM 896-7	-	-
<u>Pseudomonas cepacia</u> ATCC 25609	-	-
<u>Actinetobacter ceccometicus</u> ATCC 23055	-	-
<u>Branhamella catarrhalis</u> LNC 5128	-	-
<u> Bordetella pertussis</u> NCTC 8189	-	-
<u>Escherichia coli</u> B	-	-
<u>Neisseria meningitidis</u> NCTC 10025	-	-

持表平5-504889 (41)

ブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、細胞の分類単位のドット・スポットした、変性したゲノムDNAを使用した。

両方のアローブを使用したハイブリダイゼーション結果を以下の表にまとめた。使用したハイブリダイゼーション及び洗浄温度では、アローブBII1は *Rheophilus influenzae* バイオグループ *influenzae* 株にハイブリダイズしなかった。アローブBII2は、両方のバイオグループの株にハイブリダイズした。両方のアローブは、表示温度で、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium から得た他の15種類の *Rheophilus influenzae* バイオグループ *influenzae* の臨床型菌株にもハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーション混合物は、 $3 \times SSC$ 、 $25\text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド(20%、v/v)、Ficoll(0.025%、v/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%、v/v)、ポリビニルピロリドン(0.02%、v/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA( $0.1\text{mg mL}^{-1}$ )であった。洗浄液は、 $3 \times SSC$ 、20%ホルムアミド及び $25\text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液pH7.1を含んでいた。

**Fig. 1**

AGAGAAGGAAAGGGCTTCTAGGCATTCACTTATCGTAAACTGAAAAGA - 50  
 AGAGAAGGAAAGGGCTTCTAGGCATTCACTTATCGTAAACTGAAAAGA - 50  
  
 TCGGGAAGAACCTTGAGTGAAGGCAGGTTCCGTTAAAGAAGGGAAACCGG - 100  
 TCGGGAAGAACCTTGAGTGAAGGCAGGTTCCGTTAAAGAAGGGAAACCGG - 100  
  
 GTTTGTAGCTCACGGTTAGAGCACCCTGATAAGCTGAGCTCGGA - 150  
 :::::::::::::::::::::  
 GTTGTAGCTCACGGTTAGAGCACCCTGATAAGCTGAGCTCGGA - 150  
  
 GGTTCAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGCATAGCTAGTTGGT - 200  
 :::::::::::::::::::::  
 GGTTCAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGCATAGCTAGTTGGT - 200  
  
 AGAGCACCTGCTTGCAGCAGGGGGTCACTGGTTGCATGCCCTTGCT - 250  
 :::::::::::::::::::::  
 AGAGCACCTGCTTGCAGCAGGGGGTCACTGGTTGCATGCCCTTGCT - 250  
  
 CCACCAAAACTTACAAATGAAAGCAAGTTGCTGTCTTATAGCACTTAT - 300  
 :::::::::::::::::::::  
 CCACCAAAACTTACAAATGAAAGCAAGTTGCTGTCTTATAGCACTTAT - 300  
  
 TTGTGATTGGCCAAGTAGAAATACGGACCCATCGCATC  
 :::::::::::::::::::::  
 TTTCATTTGGCCAAGTAGAAATACGGACCCATCGCATC

**Fig. 2**

AGAGCTTGTGCTCGTCACAGTGTCACGCCATTGCGTTCTGTAT -50  
AGAGCTTGTGCTCGTCACAGTGTCACGCCATTGCGTTCTGTAT -50  
  
ATACCTGCTGGATCGGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGGTTTCCCGGG -100  
ATACCTGCTGGATCGGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAGGTTTCCCGGG -100  
  
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGGCACCGCTCTGATAAAGCCGGGGCTGCTT -150  
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGGCACCGCTCTGATAAAGCCGGGGCTGCTT -150  
  
GTCGGRATCCACCAAGGCCACCAAGGTTTCCCTGAGAGGGAAATGCCGGT -200  
GTCGGRATCCACCAAGGCCACCAAGGTTTCCCTGAGAGGGAAATGCCGGT -200  
  
GTAGCTCAGCTGGAGACCCCTGCTTGCAGCAGGATGTCATCGGTT -250  
GTAGCTCAGCTGGAGACCCCTGCTTGCAGCAGGATGTCATCGGTT -250  
  
GATCCCCCTCACCTCCACCAAAGGCCCTGTCAGAGGAATGGCTGTGRRNNH -299  
GATCCCCCTCACCTCCACCAAAGGCCCTGTCAGAGGAATGGCTGTGRRNNH -299  
  
-----AGACCGAGAGGCCAGAGAGCAACGGTTAGTCCTGCGAGTCAGT -342  
CAGGGCAGACCAAGGAAGGCCAGAGAGCAACGGTTAGTCCTGCGAGTCAGT -350  
  
TTAACGGTTGGGTTTGGCCGACAGCTATATCTCTTAAACATTGG -392  
TTAACGGTTGGGTTTGGCCGACAGCTATATCTCTTAAACATTGG -392  
  
AAGAACCCACAACCTAAAGTGTCTGGTTTAAGTAGTCGGCCGAGTCGATGAA -442  
AAGAACCCACAACCTAAAGTGTCTGGTTTAAGTAGTCGACGGAGTCGATGAA -450  
  
GACGGATACCGGTTGTGATGTCATGATTTGTCTCAAGTCATCAQAACTG -492  
GACGGATACCGGTTGTGATGTCATGATTTGTCTCAAGTCATCAQAACTG -492  
  
GCTGGCCGCCAACGGCTTGGCTCACATCTTGAACCTATGACGGCACA -542  
GCTGGCCGCCAACGGCTTGGCTCACATCTTGAACCTATGACGGCACA -550  
  
AGCGCAATGNAACAGCACCTATAAACACTTGTGTTATAG -582  
AGCGCAATGNAACAGCACCTATAAACACTTGTGTTATAG -582

**Fig. 4**

-AG-CAGAAAGAACGGCTT---AGGCATTCACACTTATCGGTAACTGAA  
 -47  
 -AAGGCTTGACTCTGCTGTCAAAGTGTCCACGGCTTATCGGT---TGTG  
 -46  
 AGATGCCGAGAACGCTTCACTGAAGGCAAGGTTCCGCTTAAGACGGAAAC  
 -97  
 TTAGATAGCTCCTGATCGGGGCTCT-GATCGGGAGAACGAAAGGTTTC  
 -95  
 -CGGGTTGACTGCTCGGTAGGACACAGCTTGTATAAGCGTGGGT  
 -146  
 CGGGCTGCTGAGCTCAGTCGTTAGGACGACCGCTTGTATAAGCGGGGGT  
 -145  
 CGGAGGTTCAAGTCCTCCAGACCCCCAACAG-----RACG  
 -181  
 CGTGGTTCGAACTCAACCGACCCCCAACGAGGTTCTCTGAGGGAATG  
 -195  
 GGGGCATAGCTCACTTGGTAAAGGCCACCTGCTTTCGAAAGCAGGGGTCTC  
 -221  
 GGGGTCTAGCTAGCTGGAGAGGCCCTGCTTTCGAAAGCAGGGGTCTC  
 -245  
 GGTTCGATECCCGTCTCCACCTCCACCAAAAGCTTGTCTGAGGAAAGTTT  
 -261  
 GGTTCGATECCCGTCTCCACCTCCACCAAAAGCTTGTCTGAGGAAAGTTT  
 -295  
 GCTTTTTTACGACCTTATTGATTGCTGGAAAGTAGATAAGACGACCATC  
 -331  
 MNNGAGACCCAGAGGGCAGA--GA--GCAACGTT--ACTGCTGGAGTC  
 -338  
 GATCTTAAACAAATTGGCAAAGGCCGAATAACAAACAAAGCACAAAGTCTT  
 -381  
 AGTGTAAAGCT--TTG--GTTTGTGGCCGACAGCTATATA--T--GTT--378  
 TGTTTTTGATTTTTATCTTGTCAAAGGATAAAAAATC-TCTTCAGAG  
 -430  
 CTTTAAACATTGGAAAGACACAAACCTA-AAGTGTCTGTTAGTAGTCG  
 -427  
 AAAAGAAAACAAACATA-GTATTTGGGTCTGATGTTGATCCTACTAAAC  
 -479  
 CGCCGAGTCGATCAAGACGGATACGGGTTCTGATGTCAT-GATTTGTC  
 -476  
 TGAACACAAACAGGAGGATTAAGCACACAAACAAACGGTACGGGTTATCA  
 -529  
 CAAGTCTCAACAA-CCTGCTGCG--CGGCCGAC-67--TGTGTC  
 -516  
 AACTAGGGATTCAGTTGCTTACTAGTCATA-CGGGCTAGGAAACGAA  
 -578  
 TAACTGTTGTTGCTTACGTTGCTTACTAGTCATA-CGGGCTAGGAAACGAA  
 -580  
 GTCAAGAAGCTTGTAAAGTAGAG--603  
 CTTAAAGACTTGTAGT--TTATAG--582

**Fig. 3**

Fig. 5

Fig. 6

C----- -1  
 :  
 CTTAACCTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCACTGACTGGGTGA -50  
 :-----AG-----ATCAC----- -18  
 ::::: ::::: :::::  
 AGTCGTAAAGGTAAACCTAGGGGACCTCGGGTTCGATCACCTCTTA -100  
 :-----AAGTA-----CTAACACAGATTGTGATCTTGTGTT -48  
 ::::: ::::: :::::  
 CCTTAAAGAAGCGTACTTTGTAGTCACACAGATTGTGATAGAAAG -150  
 AGA-----CAAGTCG-----GAATA---- -63  
 ::::: :::::  
 TGAAAAGCAGGCCCTTACCGGTTGGGAGTGAGGCTGAAGAGAAAGGC -200  
 CAT-----CTT-----AAATGT---- -76  
 ::::: :::::  
 CGTCGCTTCTTATTAATGAAAGCTCACCCACAGAAATATCACCCAA -250  
 :-----TGTCCCCATCTGCTAGAGGECTAGGACAT -106  
 ::::: :::::  
 CGCGTGTAAAGGAACTTCGTTGTCCTCTC-GTCTAGAGGCCAGGACAC -299  
 CGCCCTTCTACCGGGCTAACGGGGTTCGAANCCC-C-GGGAGGCCATC -154  
 CGCCCTTCTACCGGGCTAACAGGGGTTGAACTCCCTAGGGAGGCCA-C -348  
 TAAAGATGATTTT-ATTCCTTATGT---CTTAAAGGAAAGCAA -201  
 TT--GCTCGTTCTGAGTCAAGTCGCCACCTTAATCTCAAACTCA -396  
 GCT---GAAAGCTGAGGATTTCTAAAGTAGAAAGCTGAGT-ATCT -246  
 ::::: :::::  
 TCTTCGGGTGATCTTGGAGATTTGCTCTTTAAATCTGATCAAGCT -446  
 AAAATCTTAG---CTCAAAAGCAGCTAACGTTAGTCTAAATCATT -293  
 ::::: :::::  
 GAAATGAAACACTGAAACAGGAGTTCTCCG-AGCTCTCAAAAT -495  
 AACCAAGTATATCATATGCTCCGCAATAAAATCTGAGGCTG -343  
 ::::: :::::  
 TTGG-CAACACGAT---GATGAATCGA---AAGAACATCTCGGGTGTG -537  
 TAT -346  
 TGA -540

Fig. 7

ACGAAGTTATCTGATTGCAAGAATCCACAACAGTTCTTGTGAAAG -50  
 ::::: :::::  
 ACGAGATTATCTGATTGCAAGAATCCACAACAGTTCTTGTGAAAG -49  
 ATGTTTAAAGCCTGCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTGATA -100  
 ::::: :::::  
 CTAAAGTTAAAGCCTGCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTGATA -99  
 ACGGGGGGCTCATAACTGCAAGCTTATTAGACCCACATTTGGGCCCA -150  
 ::::: :::::  
 AGGGGGGGCTCATAACTGCAAGCTTATTAGACCCACATTTGGGCCCA -149  
 TAGGTCAGTGGTAGAGCCCTGCTTGCACGCAGGAGTCAGGAGTCG -200  
 ::::: :::::  
 TAGGTCAGTGGTAGAGCCCTGCTTGCACGCAGGAGTCAGGAGTCG -199  
 ACTTCCTTGCCTTACCAAGCAAGTTAAACATCAAATGAGACTAACATCAAAT -248  
 ::::: :::::  
 ACTTCCTTACCAACTAACATCAAATGAGACTAACATCAAAT -249  
 GCAAT---TTAAATAAAGATTCTTATTTATGTTT---TATTTA-TA -289  
 ::::: :::::  
 TAGATATCATAAAATAGATTCTTACTCTTATGAGATGACTTA -299  
 :-----AACTGAGGAGTTATAACA-TTATTTAAACATAG-TATGAGT -332  
 ::::: :::::  
 CAATTAACCTGAGGTTAATTCCTAACTTAAACAGTATATAGAGT -349  
 CTGGGTTAATTTATTCCTAACTTAAACCTTAAACCTTGTAC-C -381  
 ::::: :::::  
 CTGGGTTAATTTATTCCTAACTTAAACCTTAAACCATTCGGTCAACTC -399  
 CA-----ATACAAACCCAAA-----A -398  
 ::::: :::::  
 CACATCAAGCATATAAACTTAAACCTTGTATTGATGATCGGATA -449  
 AACGTAAGAGAAACTGAACTCAAGCTAACATAGGTAATCGTTACACATT -448  
 ::::: :::::  
 AAGTAAAGAGAAACTGAACTCAAGCTAACATAGGTAATCGTTACACATT -499  
 ACCATACACACCAAAAGACTTCTAGAAGTCAGACTACTTGGGTGTAT -498  
 ::::: :::::  
 ACCATACACACCAAAAGACTTCTAGAAGTCAGACTACTTGGGTGTAT -549

Fig. 8

CTGAAAGCCAGAGACAGCAGTGTCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50  
 ::::: :::::  
 CCCAAGCAGGAGAGACAGCAGCTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50  
 ACAAGATTAAAAACGAAGGAAAGCAACGTTGAAAAATAACCTTAAAG -100  
 ::::: :::::  
 ACAAGATTAAAAACGAAGGAAAGCAACGTTGAAAAATAACCTTAAAG -100  
 ATAAAAAGAAAAATAGATATCTTAAATGTGTCCTCATCGCTAGAGGC -150  
 ::::: :::::  
 ATAAAAAGAAAAATAGATATCTTAAATGTGTCCTCATCGCTAGAGGC -150  
 CTAGGACATCGCCCTTACGGGGTAACCGGGTTTCGAATCCCGTGGG -200  
 ::::: :::::  
 CTAGGACATCGCCCTTACGGGGTAACCGGGTTTCGAATCCCGTGGG -200  
 AGCCCAATTAAAGATACTTTAGATTGTCTTACTGTCTTAAATT -250  
 ::::: :::::  
 AGCCCAATTAAAGATACTTTAGATTGTCTTACTGTCTTAAATT -250  
 TTGGAAAACAACCTGAAAAACAGAGTTTCGAGAGAAGAGTCTGAGTAGGC -300  
 ::::: :::::  
 TTGGAAAACAACCTGAAAAACAGAGTTTCGAGAGAAGAGTCTGAGTAGGC -300  
 AAGATAGGAAAGTGGAGGGAGGAACGTAAAGGGAACTCTAAACAAA -350  
 ::::: :::::  
 AAGACAGGAAAGTGGAGGGAACTGAGAAGGAAACTCTAAACAAA -350  
 ACCTGTTTGATAAAA-TCTTGATGAAACAAAGCAATCAAGTTGTAG -399  
 ::::: :::::  
 -CCCTGTTTGATAAAAATCTTGATGAAACAAAGCAATCAAGTTGTAG -399  
 TTGAATGAAAATACGCATCAAATGACCGCCTTGAAGTGAAGAAACTTAA -449  
 ::::: :::::  
 TTGAATTAA-TGAGGCTGAAAGTCAGTCACAAAGTACGGTATCTTAA -447  
 -AGTGA---TTGAAACATTTGAGGTGAT -474  
 ::::: :::::  
 TATTGAGTTTGAAACATTTGANNNNN -476

Fig. 9

AAGGATAAGGAA-CTGGCCATTG-GTCTTGTGTTAGTCTGAGAGGTCTT -47  
 ::::: :::::  
 AAGGATAAGGAAACCTGCATTTGGCTTGTGTTAGGTTGAGAGGTCTT -50  
 CTGGGGGCTTCTAGCTCAGCTGGGAGGGCCCTGCTTGTGAGAGGTCTT -97  
 ::::: :::::  
 CTGGGGGCTTCTAGCTCAGCTGGGAGGGCCCTGCTTGTGAGAGGTCTT -100  
 AGGGTTGATCCCGTCTAGGCTCCTTGTGAGAGATCACCAAGTAATGC -147  
 ::::: :::::  
 AGGGTTGATCCCGTCTAGGCTCCTTGTGAGAGATCACCAAGTAATGC -148  
 ACATGAAAATTGAAATATCTATATCAAAATTCACCATCTAGAAATAGATT -176  
 ::::: :::::  
 TCATGAAAATTGAAATATCTATATCAAAATTCACCATCTAGAAATAGATT -198  
 :-----AGTAAACAAAGAAAATACCGCAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG -218  
 ::::: :::::  
 GTAGAAAGTAAACAAAGAAAATACCGCAAAACGCTGTGAAATTTAATGAG -248  
 AGTTTATGACTGAAAG---TCAGAAATATAA -246  
 ::::: :::::  
 TTTCTAGTTTAAAGAAAATAGGTTAAATAA -279

Fig. 10

```

TAAATCTAAAGCAAGTATAAAGTAGATTAAATATAAAACAAACTC -50
TAAATCTAAAGCAAGTATAAAGTAGATTAAATATAAAACAAACTC -50
TATACTTAGATTATTTTATCTTTAACTATAAAAAGAAATATACTTTAATA -100
TATACTTAGATTATTTTATCTTTAACTATAAAAAGAAATATACTTTAATA -100
AATATAAAATAACATACATAATTAGTATTATTTATAATGAGATTATT -150
AATATAAAATAACATACATAATTAGTATTATTTATAATGAGATTATT -150
AATATAATGCTTCCTTTAGGTTTAAACCTAAATGTTCTTTAAATTAT -200
AATATAATGCTTCCTTTAGGTTTAAACCTAAATGTTCTTTAAATTAT -200
CATGTTAAAGACTCACAAAGTTTAAATAAAACATTACAGGACT -250
CATGTTAAAGACTCACAAAGTTTAAATAAAACATTACAGGACT -250
TGTTAAAGGATAAACCTATTTATCTTTCTGGTTAACTTATATCTT -300
TGTTAAAGGATAAACCTATTTATCTTTCTGGTTAACTTATATCTT -300
TTAATTATCTTTATCTATAAAAGAAATTTAGATTAAAGATTAT -350
TTAATTATCTTTATCTATAAAAGAAATTTAGATTAAAGATTAT -350
AAATTAAGACAAGTTCAAACTCACAGCTTAGTGGAGACTAAATCATTT -400
AAATTAAGACAAGTTCAAACTCACAGCTTAGTGGAGACTAAATCATTT -400
AGTTTATTAAGTGTGATGCTTCCTCTTAAGATAAAAGACTCT -450
AGTTTATTAAGTGTGATGCTTCCTCTTAAGATAAAAGACTCT -450
TATCATAAAACCTTAAACAGGAAGTGATGCGTTTAAAGATAAAATAAA -500
TATCATAAAACCTTAAACAGGAAGTGATGCGTTTAAAGATAAAATAAA -500
AAGGTTAAAAAA -511
AAGGTTAAAAAA -511

```

補正書の写し（開訳文）提出書（特許法第111条の1）

平成4年10月19日

特許庁長官 麻生 波 肇

1. 特許出願の表示 PCT/EP 91/00743

2. 発明の名称 16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から構成される非ウイルス微生物検出用  
ハイブリダイゼーションプローブ

3. 特許出願人  
住所 ベルギー国、バー-9110-ヘント、ボックス・4、  
インドストリーパルク・ズペイナールデ・1  
名称 エフ・バー・イノヘネティクス・エス・ア-

4. 代理人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル  
(郵便番号 160) 電話 (03) 3354-8623  
(6200) 弃却士 川口義雄  
(ほか3名)

5. 補正書の提出年月日 1992年2月5日

6. 添附書類の目録

(1) 補正書の開訳文



1通

## 要約

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特徴的には細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチド～スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15～約100ヌクレオチドから構成される非ウイルス微生物検出用プローブに係る。

*Branhamella catarrhalis*は、重い気道感染症によく含まれる(BAGERら, Rev.Infect.Dis.9:1140-1149,1987)。*Branhamella catarrhalis*の診断には、特殊培養基を必要としない致病菌による異常増殖により阻止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共歯生物(例えば、*Neisseria*種など)とを区別するための一組の表現型試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来の*Branhamella catarrhalis*を差別化する試験が限られているので、表現型試験は、推定上の*Branhamella catarrhalis*単離物の識別に関しては決定的ではない(RIOU及びGUIBOURDENCHE, Drugs 31[補遺.3]: 1-6, 1986)。分析に基づいたDNAプローブを使用すると、*Branhamella catarrhalis*の検査と診断をかなり簡素化できる。未特定位DNAフラグメントから誇張し、*Neisseria caviae*由來のDNAで交差ハイブリダイズした*Branhamella catarrhalis*用のDNAプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている(Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No.D-249, 1989)。

*Branhamella catarrhalis* ITG 4197のrRNA遺伝子の一部

特表平5~504889 (46)

を、ポリメラーゼ链反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローン化した。続いて16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキシ鎖停止法により配列した。この配列は図7に示されている(上界)。配列データより、以下のオリゴヌクレオチド:

TTAACACATCT TACCAAAAC BCI1

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末端でポリヌクレオチドキナーゼで<sup>32</sup>Pラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の81 Brachamella catarrhalis株及び他の細菌分類の18株のドット-スポットした、変性ゲノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7. 脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v)、ポリビニルヒロリドン(0.02%, w/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA(0.1mg/mL<sup>-1</sup>)であった。

ターゲットとして、種々の位置からの41 Haemophilus ducreyi株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ドット-スポットした変性したゲノムDNAを使用した。他の Haemophilus ducreyi株にもっぱらハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC(1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで添加したこととを除いて、3×SSC、25mM リン酸カリウム緩衝液、pH7. 脱イオン化ホルムアミド(20%, v/v)、Ficoll(0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%, w/v)、ポリビニルヒロリドン(0.02%, w/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA(0.1mg/mL<sup>-1</sup>)または、非放射性DNAラベル及び検出キット(Boehringer Mannheim製)のプロトコルシートの溶液であった。

この生体の培地は、困難で且つ感度が無いが、依然として、Haemophilus ducreyi感染の診断のための選択方法である。特異性の高いプローブを使用すると、培地が不要で且つ診断の感度が強くなる。他のHaemophilus及びPasteurella属と弱い交叉反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をターゲットとする Haemophilus ducreyi用のクローン化したDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている(J.Clin. Microbiol. 27:1441-1445, 1989)。

Haemophilus ducreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一部をポリメラーゼ链反応により酵素的に増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列は、ジデオキシ鎖停止法により得られた。核酸配列より、以下のオリゴヌクレオチド:

TTATTATCGG CGAGCCATAT TG RDI1

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で<sup>32</sup>Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジゴキシン化UTPでその3'末端を結合し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

補正書の草し(翻訳文)提出書(特許法第184条の1)

平成4年10月19日



特許庁長官 麻 生 渡 駿

1. 特許出願の表示 PCT/EP 91/00743
2. 発明の名称 16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誇導される非ウイルス微生物特有DNAハイブリダイゼーションプローブ
3. 特許出願人 住所 ベルギー國、バー-3710・ヘント、ボックス・1、インドウストリーパルク・ズペイナールデ・1  
名 称 エタ・ベー・イノヘネティクス・エス・ア-
4. 代理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番1号 山田ビル  
(郵便番号 160) 電話 (03) 3334-8821  
(020) 弁理士 川口義雄  
(署名 3名)
5. 補正書の提出年月日 1992年2月25日

6. 添附書類の目録

(1) 補正書の翻訳文



1通

### 請求の範囲

1. 原核生物、より特定期には細菌の 16S 及び 23S rRNA 遺伝子間の転写スペーサー領域の少なくとも約 15 ネクレオチド、好ましくは約 15 ネクレオチド～スペーサー領域のはば最大数のネクレオチド、より好ましくは約 15 ～約 100 ネクレオチドから構成されるプローブ。

2. 検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定期には細菌に固有であるように選択された rRNA 遺伝子間のスペーサー領域、特に 16S rRNA 遺伝子及び 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブであって、rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の前記配列が。

\* 目的生物の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近開発の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較し。

\* 最近開発のうちの少なくとも 1 種の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも 1 つのミスマッチを有する目的生物の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域の少な

### 特表平5-504889 (46)

くとも約 15 ネクレオチド、好ましくは約 15 ～ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約 15 ～約 100 ネクレオチドの配列を選択することにより、又は

＊短縮スペーサー領域を得るように、目的生物の rRNA 遺伝子間のスペーサー領域から tRNA 遺伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ。

\* 少なくとも約 15 ネクレオチド、好ましくは約 15 ～スペーサー領域のはば最大数のヌクレオチド、より好ましくは約 15 ～約 100 ネクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸 (DNA 及び / 又は RNA) と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより、

選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブ。

#### 3. 一株群グループ：

##### グループ NCII:

CGATGCCCTCG TTATTCTACT TCCC	NCII
CCCAACTAGA ATAACCAACGC ATCG	NCIIC
CCCAACUACA AUAAACGACGC AUCC	NCIICR
CGAUGCCUCG UUAUUCUACU UCCC	NCIIR

##### グループ NCII2:

TTCGTTTAC TACCCGTTCA CTAAGTAACC AAAC  
GTTTCTTAC TTACTCAACC CGTAGCTAAA CGAA  
GUUCCGUAC UUACUCAAACG CGUACGUAAA CGAA  
UUCGUUDACC UACCCGUUGA CGAACUAAAC AAAC

NCI2  
NCI2IC  
NCI2ICR  
NCI2R

##### グループ NMII:

GGTCAACTGT CACCTCCCCC TG  
CACGGCCACG TCACACATTGA CC  
CAGGGCCACG UCACACUUCG CC  
GGUCAAGCU CACCCUCCCC CG

NMII  
NMIIIC  
NMIIICR  
NMIIIR

##### グループ NMII2:

GTTCTTGTCA AAGTGTGACG TC  
CACGTCAACAC TTGACCAAGA AC  
GACGUACACG UUACCAAGA AC  
CUUCUUGGUC AACGUACGAC CG

NMII2  
NMII2IC  
NMII2ICR  
NMII2R

##### グループ NMII3:

GGGTTCTTA TAGCTATCTA CTGTGC  
GCACACTACA TAGCTATAAC GAACGC  
GCACAGUACA UACCUADAAC GAACGC  
GGCUUCCGUA UACCUAUCUA CGUCC

NMII3  
NMII3IC  
NMII3ICR  
NMII3R

##### グループ NMII4:

TCCCTTCGAT ATTGCTATCT ACTCTGCA  
TCCACACTAG ATAGCAATAT CGAACCCA  
UCCACAGUAC AUACCAAUAU CGAACCCA  
UCCGUUCCAU AUUCCUAUCU ACUGUCCA

##### グループ NMII5:

TTTGTCTCTGGTCAACTGTGACCTCCCCCTCAATGGATTCCTTCCATT  
ATGCAACAGAAATCCATTCAAGGGCACGTACACTTGACCAAGAACAAAA  
AUUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCCACCUACACUUGACCAAGAACAAAA

##### グループ NMII5IC:

UUUGGUUCGUUGCUAACUGUGACGUCCUCUAAUUGGUUCGUUCUCAUU  
NNI5R

##### グループ NMII6:

TTGCCCTAAC ATTCCGTTCA CTAGAACATC AGAC  
CTCTGATGTT CTAGTCAACG GATCTTACG CAAA  
GUCUAGUUC GUACUCAACG GAACGUUACG CAAA  
UUUCCUUAAC ADUCCGUUGA CUACAAACUAC AGAC

##### グループ BDII:

TTATTATCGG CGACCCATAT TG

BDII

## 特表平5-504889 (4)

CAATATGCCCT CCCCCATAAT AA	BII1IC	AAGTGGGTC AATTGATCC GT	BII1C
CAAUUUCCCG CCCCCAUAAU AA	BII1ICR	AACGUCCCCUC AACUUUCAUGC GU	BII1CR
UUUUUAUCCG CGACCECAUAA UC	BII1IR	ACCCAUCAAA UUGACCCAC UG	BII1R
グループ BCII:		グループ BII2:	
TTAACATCT TACCAAAAC	BCII	ACTTGAAGT GAAAGCTTAAC AG	BII2
CCTTGCTAAG ATGTTAA	BCII1IC	CTTTAACTTT TCACCTCAAAG CT	BII1IC
CUUUGGUAAAC AUGUAAA	BCII1ICR	CUUUAACUUG UCAUCUCAA GU	BII1CR
UUAAAACAUU UACCAAAAC	BCII1IR	ACUUUCAAGU GAAACAUUAA AC	BII2R
グループ BCI2:		グループ SAI1:	
TTGATGTTTA AACTTGCTTC GTGGA	BCI2	AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
TCCACCAAGC AACTTTAAAC ATCAA	BCI2IC	AACAAATTGA ACCTTTGGAT T	SAI1IC
UCCACCAAGC AACGUUAAAAC AUCAA	BCI2ICR	AACAAUUGA ACCUUBUCCAU U	SAI1CR
UUCAUCUAAA AACGUUCCUUG GUCCA	BCI2R	AADCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SAI2R
グループ BPII:		グループ SAI2:	
CCACACCCAT CCTCTGCACA CGCTT	BPII	CGAAACCTGC CATTTGGTC TT	SAI2
AAACCTCTCC AGAGGATGGC TGTGG	BPII1IC	AAACACCCAAA TGGCACGGTT CC	SAI2IC
AAACCCUCUCC AGAGGAAUCCG UGUCC	BPII1ICR	AAACACCCAAA UGGCACGGUU CC	SAI2CR
CCACACCCAU CCDCUCCGACA CCCUU	BPII1IR	CGAAACCCUCC CAUUGUCCGUC GU	SAI2R
グループ BIII:		グループ SAI3:	
ACCCATCAAAT TTCACCCAC TT	BIII	TCCACCATCT AGAAATAGAT TCTACAA	SAI3
TTCTACAAATC TATTTCTAGA TCGTGG	SAI3IC	TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC	SPI3IC
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCCUGGA	SAI3ICR	UUCUCAAUU UCAUCUAAA ACUC	SPI3ICR
UCCACCAUCU AGAAAUAACAU UCUACAA	SAI3R	GAGUUUAUGA CUGAACCCUC AGAA	SPI3R
グループ SAI4:		から選択される核酸に属しており且つ 1 5 ~ 選択された核 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は 下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標的 配列と同一の RNA 又は DNA 様的とハイブリダイズする という条件下で、	
TCTACTTTTA AACAAACTAC GTT	SAI4		
AAACCTAGTTT CTTTAAACT AGA	SAI4IC		
AAACCUACUUU CUUAAAACU ACA	SAI4ICR		
UCUAGUUUUA AACAAACUAG GUU	SAI4R		
グループ SPII:		・夫々の末尾のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、	
GTCACAGATC ACCAACTAAT CCA	SPII	・前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換さ れているか、	
TGGATTACTT CGTGATCTCT CAC	SPII1IC	・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のプローブ。	
UCCAUUACUU GGUCAUUCU CAC	SPII1ICR		
CUCACACAU ACCAACAUAA CCA	SPII1R		
グループ SPI2:			
AGGAACCTGGG CATTCGGCTT	SPI2	4. 1 種以上の <u>Nelsseria gonorrhoeae</u> a.e. 株を検出するためのプローブであって、	
AAACACCAATC CECAGTTCT	SPI2IC		
AAACACCAAUCC CGCAGUCCU	SPI2ICR	・核酸グループ：	
ACCAACUCGG CAUUGUCCUU	SPI2R	グループ NCII:	
グループ SPI3:			
CACTTTATCA CTGAAACGTC AGAA	SPI3	CGATGGCTTC TTATTCATCT TCGG	NCII
		CCCAGTACA ATAACGACCC ATCC	NCII1IC

特表平5-504889 (48)

CCGAACUAGA AUAAACCACCG AUCC	NC111CR
CGAUGCCUCG UUAUUCUACU UCCC	NC11R
グループ NC12:	
TTCGTTTACG TACCCGTTGA CTAAGTAACC AAAC	NC12
CTTTCCCTAC TTACTCAACC CGTAGCTAAA CGAA	NC12IC
GUUUCGUACUAC UUAGCUAACG CGUACGUAAA CGAA	NC121CR
UUCCGUUACU ACCCCCCUUA CUAAGUAACC AAAC	NC12R

から選択される核酸に属しており且つ1～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA様的とハイブリダイズするという条件下で、

- 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、
- 前記配列のいずれかで1箇以上ヌクレオチドが置換されているか、
- その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

5. 生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae株を検出するための方法であって、場合に

よりアロープの標的配列を交叉する(*flanking*)2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な条件でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のプローブと検出させる手段と、特にサンプル中に存在し得るNeisseria gonorrhoeae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する手段とを含むことを特徴とする方法。

6. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約2.5mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サ

ケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、2.5mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50°Cの範囲及び/又は洗浄温度が約50°Cの範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

CCGAACUAGA ATAACCCACCG ATCC

HT及び/又はWT: 50°C、

GUUUCGUAC UUAGCUAACG CGUACGUAAA CGAA

HT及び/又はWT: 50°Cであることを特徴とする請求項5に記載の生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeaeを検出するための方法。

7. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Neisseria gonorrhoeae株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

- 請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは全Neisseria

la gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的とし、少なくとも1種がNeisseria gonorrhoeaeに対して特異的であり且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

## 特表平5-504889 (49)

一 酶素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと Neisseria gonorrhoeae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と。

一 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

8. 1種以上の Neisseria meningitidis 株を検出するためのアロープであって、

一 核酸グループ：

グループ NM1:

GCTCAAGTGT GACCGCCGCC TG	NM1
CAGGGGAGCG TCACACTTGA CC	NM1IC
CACCCCCGACC UCACACUUGA CC	NM1ICR
GGCUAAGUCU GACGUCCCCC UC	NM1R

グループ NM2:

TTTCTTCGTC AACCTGTGACG TC	NM2
GACCTCACAC TTGACCAAGA AC	NM2IC
GACCCACAC UGACCAAGA AC	NM2ICR

グループ NM16:

TTTGCCTAAC ATTCCTGTGA CTAGAACATC AGAC	NM16
GTCTGATGTT CTACTCAACC GAATGTTAGG CAAA	NM16IC
CUCUCAUUU CUACUCAAGC GAAUCUAGG CAAA	NM16ICR
UUUCCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACABC AGAC	NM16R

から選択される核酸に属しており且つ 15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一の RNA 又は DNA 細胞的とハイブリダイズするという条件下で。

一 夫々の末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか。

・前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換されているか。

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするアロープ。

9. 生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis 株を検出するための方法であって、場合によりアロープの標的配列を夾叉する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介

GUUCUUGGUC AAGUGUGACCC UC	NM12R
グループ NM13:	
CCCTTCGTTA TAGCTATCTA CTCTGC	NM13
CCACACTACA TAGCTATAAC CAACCC	NM13IC
CCACACUAGA UACCUUAUAC CAACCC	NM13ICR
CCGUUCGUUA UACCUAUCA CUCUCC	NM13R
グループ NM14:	
TGCCCTTCCAT ATTCTTATCT ACTCTGCA	NM14
TCCACACTAG ATACCAATAT CGAACCGA	NM14IC
UCCACAGUAG AUACCAAUAU CGAACCGA	NM14ICR
UCCGUUCGAA AUUCCUAUCG ACUGUGCA	NM14R
グループ NM15:	
TTTCTTCTTCGTC AACGCTGACCTGACCTGAAATGGATTCTGTTCCATT	NM15
AATGGAACAGAACATTCAAGGGGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA	NM15IC
AAUCCAAACACAAUCCAUUCAGGGCACGUACACUUGACCCAAACAAAA	NM15ICR
UUUUGUUCGUUCGAAAGUGUGACCBCCCCUGAAUCCAUUCGUUCGUCAAU	NM15R

するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA 又は RNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アロープとサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項 8 に記載のアロープと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Neisseria meningitidis 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするアロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。  
10. ハイブリダイゼーション媒体が、約 3×SSC (1×SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約 25 mM のリン酸緩衝液 pH 7.1、20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1 mg/ml の剪断性サケ精子 DNA を含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約 3×SSC、25 mM リン酸緩衝液 pH 7.1 及び 20% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア

特表平5-504889 (50)

seria meningitidis 株を in vitro で検出するためのキットであって、

- 試験項 8 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、

- これらのプローブと多數、好ましくは全 Neisseria meningitidis 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 一株該菌分子を標的的にし、少なくとも 1 種が Neisseria meningitidis に対して特異的であり且つ試験項 8 に記載のプローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のプローブと、

- これらのプローブと Neisseria meningitidis 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

ドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
ハイブリダイゼーション温度が約 40~58°C の範囲及び/又は洗浄温度が約 40~58°C の範囲に適宜調節され、特に、前記他の配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が決定。

CACCGCCGAGG TCACACTTCA CC

HT 及び/又は WT : 45°C.

GACGTCAACAC TTGACCAAGA AC

HT 及び/又は WT : 45°C.

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAAAGC

HT 及び/又は WT : 40°C.

TGCCACAGTAG ATACCAATAT CGAACCCA

HT 及び/又は WT : 48°C.

TTTTCTTCTTCGCTCAAGCTCTCACCTCGCCCTCAATGGATTCTGTTCCATT

HT 及び/又は WT : 58°C.

CTCTCATCTT CTACTCAGC GAATGTAGG CAAA

HT 及び/又は WT : 50°C であることを特徴とする試験項 5 に記載の生物学的サンプル中で Neisseria meningitidis を検出するための方法。

11. 生物学的サンプル中で多數、好ましくは全 Neisse

ri

ドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
- 固体支持体に固定された試験項 4 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、  
- 該プローブの標的配列を含む DNA 及び/又は RNA の酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
- 酶素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Neisseria meningitidis 株の DNA 及び/又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

12. 1 種以上の Haemophilus ducreyi 株を検出するためのプローブであって、

- 様数グループ:

グループ BDII:

TTATTATGCC CGAGGCATAT TG

BDII

CAATATGCC7 CGCGCATAAT AA

BDIIIC

CAAGAUCCU CGCCCAUAAU AA

BDIIICR

UUAUUAUCGG CGACCCAUAU UC

BDIIR

から選択される核酸に真しており且つ 1~5~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標的配列と同一の RNA 又は DNA 様的とハイブリダイズするという条件下で、

- 多くの末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- 前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換されているか、

- その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

13. 生物学的サンプル中で Haemophilus ducreyi 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得

特表平5-504889 (51)

及び洗浄温度 (WT) が夫々、

CAATATCCCT CCCCCATAAT AA

HT 及び / 又は WT : 40°C であることを特徴とする請求項 1 に記載の生物のサンプル中で Haemophilus ducreyi を検出するための方法。

15. 生物学的サンプル中で多數、好ましくは全 Haemophilus ducreyi 株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

- 請求項 1 に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、

- これらのアローブと多數、好ましくは全 Haemophilus ducreyi 株の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的にし、少なくとも 1 種が Haemophilus ducreyi に対して特異的であり且つ請求項 1 に記載のアローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のアローブと、

る Haemophilus ducreyi 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項 1 に記載のアローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Haemophilus ducreyi 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

14. ハイブリダイゼーション媒体が、約 3 × SSC (1 × SSC = 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、約 25 mM のリン酸緩衝液 pH 7.1、20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1 mg/ml の酵素変性サケ精子 DNA を含有しており、及び / 又は洗浄媒体が、約 3 × SSC、25 mM リン酸緩衝液 pH 7.1 及び 20% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項 1 に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約 40°C の範囲及び / 又は洗浄温度が約 40°C の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT)

- これらのアローブと Haemophilus ducreyi 株の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項 1 に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、

- 该アローブの標的配列を含む DNA 及び / 又は RNA の酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び / 又はこれらのアローブと Haemophilus ducreyi 株の DNA 及び / 又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

16. 1 種以上の Branhamella catarrhalis 株を検出するためのアローブであって、

- 核酸グループ：

グループ BCII:

TTAAACATCT TACCAAAC	BCII
CTTTGCTAAC ATGTTTAA	BCIIC
CUUUGGUAG AUCUUUAA	BCIICR
UUAAACAUCAU UACCAAAC	BCIIR

グループ BCII2:

TTCATGTTTA AACTTCTTC GTGGA	BCI2
TCCACCAAGC AACTTTAAC ATCAA	BCI2IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAA ACUAA	BCI2ICR
UGCAUCUUA AACUUCGUUG CGGCA	BCI2R

から選択される核酸に属しており且つ 1 ～ 5 に選択された核酸の最大数のタクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非標的配列と同一の RNA 又は DNA 標的とハイブリダイズするという条件下で、

- 夫々の末端のいずれかに 1 又は数個のタクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- 前記配列のいずれかで 1 個以上のタクレオチドが置換されているか、

特表平5-504889 (52)

・その両方により前記配列のいずれかと異なる実験配列を含むことを特徴とするプローブ。

17. 生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 族を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な実性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブヒサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 族の相補的核酸との間にハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Branhamella catarrhalis 族のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間にハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

18. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

ナトリウム、pH 7.0)、約2.5mMのリン酸緩衝液pH 7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの酵素変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、2.5mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項16に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30~42℃の範囲及び/又は洗浄温度が約30~42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が天々、

CTTCCTAAC ATGTTAA

HT及び/又はWT: 30℃

TCCACCAAGC AACTTTAAC ATCAA

HT及び/又はWT: 42℃であることを特徴とする請求項17に記載の生物学的サンプル中で Branhamella catarrhalis 族を検出するための方法。

19. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 族を in vi-

tro 検出するためのキットであって、

-請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-これらのプローブと多数、好ましくは全 Branhamella catarrhalis 族のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が Branhamella catarrhalis に対して特異的であり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

-これらのプローブと Branhamella catarrhalis 族のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Branhamella catarrhalis 族のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

20. 1種以上の Bordetella pertussis 1型株を検出するためのプローブであって、

-核酸グループ:

グループBPII:  
CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT BPII  
AAGCCCTGTCC ACAGCATGCC TCTGC BPIIIC  
AAGCCUGUCC ACACCAUCGCC UCUCC BPIIICR  
CCACACCEAU CCUCUGGACA GGCUU BPIIR

特表平5-504889 (63)

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA類似とハイブリダイズするという条件下で。

-夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか。

-前記配列のいずれかで1箇以上のヌクレオチドが置換されているか。

-その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

21. 生物学的サンプル中でBordetella pertussis株を検出するための方法であって、場合によりアロープの標的配列を夾みする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鍵反応を使用して増幅させた検出すべき核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、アロープとサンプル中に存在し得るBordetella pertussis株の相補的

核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項20に記載のアロープと接触させる手段と、特にサンプル中に存在し得るBordetella pertussis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするアロープとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する手段とを含むことを特徴とする方法。  
22. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルビロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアロープが請求項20に記載のアロープのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

AAGCCCTGTC AGACCGATCCC TGTGG

HT及び/又はWT: 55℃であることを特徴とする請求項21に記載の生物学的サンプル中でBordetella pertussisを検出するための方法。

23. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Bordetella pertussis株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

-請求項20に記載のアロープのいずれかから選択された少なくとも1種のアロープと、

-これらのアロープと多数、好ましくは全Bordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBordetella pertussisに対して特異的であり且つ請求項20に記載のアロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のアロープと、

-これらのアロープとBordetella pertussisを

suis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

-固体支持体に固定された請求項20に記載のアロープのいずれかから選択された少なくとも1種のアロープと、

-該アロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を剪断実験するために必要なプライマーと、

-酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのアロープとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

特表平5-504889 (54)

24. 1種以上のHaemophilus influenzae株を検出するためのプローブであって、

- 植物グループ：

グループBII1:

ACCCATCAAATTCACCCCA TT	BII1
AAGTCCGCTC ATTTCATCC GT	BII1IC
AAGUGCCUCU AAUUUCAUCC GU	BII1ICR
ACCCAUCAA UUCACCGCAC UD	BII1R

グループBII2:

ACTTTGAACT GAAAACCTAA AG	BII2
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	BII2IC
CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU	BII2ICR
ACUUUAGAGU GAAAACUAAA AG	BII2R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標的配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

- 失々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか。

・前記配列のいずれかで1種以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

25. 生物学的サンプル中でHaemophilus influenzae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を夾むする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ錠反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブヒサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

26. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1

$\times$ SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH 7.0), 約25mMのリン酸緩衝液pH 7.1, 20%脱イオン化ホルムアミド, 0.02%Ficoll, 0.02%ウシ血清アルブミン, 0.02%ポリビニルビロидン及び約0.1mg/mlの算断交性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC, 25mMリン酸緩衝液pH 7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35~55°Cの範囲及び/又は洗浄温度が約35~55°Cの範囲に適宜調節され、特に、前記標的の配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々。

AAGTCCGCTC ATTTCATCC GT

HT及び/又はWT: 55°C,

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT

HT及び/又はWT: 35°Cであることを特徴とする請求項25に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus influenzaeを検出するための方法。

27. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Haemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットであって、

- 請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは全Haemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を標的にして、少なくとも1種がHaemophilus influenzaeに対して特異的であり且つ請求項24に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができ可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

特表平5-504889(55)

ドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
- 固体支持体に固定された請求項24に記載のプローブの  
いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
- 該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの  
酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
- 酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと  
Haemophilus influenzae株のDNA  
A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応  
を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成する  
ために必要な成分と、  
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ  
ドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキッ  
ト。

28. 1種以上のStreptococcus pneumoniae株を検出するためのプローブであって、

- 緊密グループ：

グルーピングII:

CTGAGACATC ACCAACTTAAT GCA	SPII
TCCATTACTT CGTGATCTCT CAC	SPIIIC
UCCAUUACCUU CCUGAUUCUCU CAC	SPIIICR

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を  
含むことを特徴とするプローブ。

29. 生物学的サンプル中でStreptococcus pneumoniae株を検出するための方法であって、  
場合によりプローブの標的配列を交叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するホリメラーゼ鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な  
変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしてお  
いた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存  
在し得るStreptococcus pneumoniae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可  
能にする条件下で請求項28に記載のプローブと接触させ  
る段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococ  
cus pneumoniae株のDNA及びRNA  
の両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッ  
ドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを  
特徴とする方法。

30. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1  
×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸

CUGAGAGAUC ACCAAGUAAA GCA	SPIIR
グルーピングII:	
ACGAACCTGGG CATTGGCTTT	SPIIZ
AAGACCAATG CGGACTTCCT	SPIIZIC
AAGACCAAUU CGGAGUUCU	SPIIZICR
ACGAACAUCCG CADUGGUCUU	SPIIZR
グルーピングIII:	
GACTTTATGA CTCAAAGGTC AGAA	SPIIZ
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SPIIZIC
UUCUGACCUC UCAUCUAAAC ACUC	SPIIZICR
GAGUUUAUCA CUGAAAGCUC AGAA	SPIIZR

から選択される核酸に異しておらず且つ15～選択された核  
酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は  
下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾  
配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズする  
という条件下で、

- ・夫々の末端のいずれかに1又は數個のヌクレオチドが  
付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換さ  
れているか、

ナトリウム、pH7.0), 約2.5mMのリン酸緩衝液p  
H7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%P  
ICol I、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%  
ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性  
サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、  
約3×SSC、2.5mMリン酸緩衝液pH7.1及び20  
%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア  
ローブが請求項24に記載のアローブのいずれかであり、  
ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲及び/又は  
洗浄温度が約45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標  
的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)  
及び洗浄温度(WT)が夫々、  
TCCATTACTT CGTGATCTCT CAC  
HT及び/又はWT: 45℃、  
AACACCAATG CGGACTTCCT  
HT及び/又はWT: 45℃、  
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC  
HT及び/又はWT: 45℃であることを特徴とする請求  
項29に記載の生物学的サンプル中でStreptococ  
cus pneumoniae株を検出するための方法。

特表平5-504889 (56)

3.1. 生物学的サンプル中で多數、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株を in vitro 検出するためのキットであって、

ー請求項 2.8 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、

ーこれらのプローブと多數、好ましくは全 Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的とし、少なくとも 1 種が Streptococcus pneumoniae 株に対して特異的であり且つ請求項 2.8 に記載のプローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のプローブと、

ーこれらのプローブと Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
ー固体支持体に固定された請求項 2.8 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、  
ー該プローブの標的配列を含む DNA 及び／又は RNA の酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
ー酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

3.2. 1 種以上の Streptococcus salivarius 株を検出するためのプローブであって、

ー核酸グループ：

グループ SAI1:

AAATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
AACAATTTCGA ACCTTTGGAT T	SAI1IC

AAACAUUUGCA ACCUUUCCAU U	SAI1CR
AAUCCGAAGG UUCAAAAUUCU U	SAI1R

グループ SAI2:

GGAAACCTGC CATTTCGGTC TT	SAI2
AAAGACCCAAA TGGCAGGTTT CC	SAI2IC
AAACACCCAAA UGCCAGGUU CC	SAI2ICR
GGAAACCCGC CAUDUGCCUC UU	SAI2R

グループ SAI3:

TCCACCATCT AGAAATAACAT TG7AGAA SAI3	
TTCTTACAATC TATTTCTAGA TCGTGA SAI3IC	
UUUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCCUGGA SAI3ICR	
UCCACCGAUU AGAAAUAGAU UCUAGAA SAI3R	

グループ SAI4:

TCTACTTTTA AAACAAACTAC GTT	SAI4
AAACCTACTTTT CTTTAAAAACT AGA	SAI4IC
AAACCUAGUUU CUUAAAACU AGA	SAI4ICR
UCUACGUUUA AAGAAACUAC GUU	SAI4R

から選択される核酸に属しており且つ 1.5 ～ 選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非標的

配列と同一の RNA 又は DNA 標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー、先々の末端のいずれかに 1 又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含むことを特徴とするプローブ。

3.3. 生物学的サンプル中で Streptococcus salivarius 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を交叉する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介するポリメラーゼ鍵反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Streptococcus salivarius 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項 3.2 に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Streptococcus

S. agalactiae 株の DNA 及び RNA の両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する手段とを含むことを特徴とする方法。

34. ハイブリダイゼーション媒体が、約 3 × SSC (1 × SSC = 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH 7.0)、約 25 mM のリン酸緩衝液 pH 7.1、20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1 mg/ml の酵断変性サケ精子 DNA を含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約 3 × SSC、25 mM リン酸緩衝液 pH 7.1 及び 20% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項 32 に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約 35～45℃ の範囲及び／又は洗浄温度が約 35～45℃ の範囲に適宜調節され、特に、前記個的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々、

AACAATTGCA ACCTTTCCAT T  
HT 及び／又は WT : 35℃、

- 同一核酸分子を標的にし、少なくとも 1 種が S. agalactiae に対して特異的であり且つ請求項 32 に記載のプローブのいずれか 1 種から選択された少なくとも 2 種のプローブと、

- これらのプローブと S. agalactiae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項 32 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも 1 種のプローブと、

- 該プローブの標的配列を含む DNA 及び／又は RNA の酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブと S. agalactiae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

ドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

35. 生物学的サンプル中で多數、好ましくは全 S. agalactiae 株を S. agalactiae を検出するためのキットであって、  
- 請求項 32 に記載のアロープのいずれかから選択された少なくとも 1 種のアロープと、  
- これらのアロープと多數、好ましくは全 S. agalactiae 株の DNA 及び／又は RNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

36. 1 種以上の Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するためのアロープであって、アロープが適切な条件で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 由来の DNA 及び／又は RNA のみとハイブリダイズし、他の生物由来の DNA 及び／又は RNA とはハイブリダイズしないという条件下で、図 10 に示す 16S-23S rRNA スペーサー配列から説明される 15～最大数のヌクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするアロープ。

37. 生物学的サンプル中で Campylobacter jejuni 及び Campylobacter coli 株を検出するための方法であって、場合によりアロープの標的配列を交叉する 2 種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のプライマーを介するポリメラーゼ链反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サ

特表平5-504889 (60)

ンブルを、プローブとサンブル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項36に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンブル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

38. 生物学的サンブル中で多數、好ましくは全Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

ー請求項36に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多數、好ましくは全Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とするキット。

39. 検出すべき微生物に特異的な請求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンブル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に *in vitro* 検出するための方法であって、好ましくはプローブ領域を夾又する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンブル中に存在する（標的配列を含む）DNA及び／又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のアローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドアローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンブルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより

又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的的にし、少なくとも1種がCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliに対して特異的であり且つ請求項36に記載のアローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のアローブと、

ーこれらのアローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー固体支持体に固定された請求項36に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、

ー該アローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのアローブと

形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とする方法。

40. 生物学的サンブル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時に *in vitro* 検出するためのキットであって、

ー検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のアローブの少なくとも1種と、

ー該アローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのアローブと検出すべき微生物のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることができない緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

特表平5-504889(69)

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	International Application No. PCT/EP 91/00743
Category	Character of Document, with date(s), name(s) of inventor(s)		Date of Prior Art
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, September 1989, pages 391-392, abstract no. 60922w, (Columbus, Ohio, US), W.E. EVANS et al.: "The use of DNA probes for taxonomic study of <i>Dityvangelium</i> wild isolates", & GENETICS 1988, 119(3), 561-9, see abstract -----		1
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 11, November 1987, abstract no. 104704, (Philadelphia, PA, US), M. VERNET et al.: "Phylogenetic implication of heterogeneity of the nontranscribed spacer of ribosomal DNA repeating unit in various <i>Neuroleptosporium</i> and related fungal species", & Curr. GENET. 21(4), 303-314, 1987, see abstract -----		3
A	EP-A,0307270 ([INSTITUT PASTEUR]) 15 March 1989, see abstract; pages 3,4; claims 1-5 -----		3
P,A	EP-A,0395292 ([BIORESEARCH IRELAND]) 31 October 1990, see abstract; page 6, lines 40-41 -----		1
A	EP-A,0337896 ([N.V. INNOGENETICS S.A.]) 18 October 1989 -----		
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 9, 28 August 1989, page 204, abstract no. 72108x, (Columbus, Ohio, US), R. ROSSAU et al.: "Specific <i>Neisseria gonorrhoeae</i> DNA probes derived from ribosomal RNA", & J. GEN. MICROBIOBL. 1989, 135(6), 3735-45, see abstract -----		1

四縣調查報告

EP 9100743  
SA 46810

This covers the patent family members relating to the patent designated above in the above-mentioned International search report. The members are as assessed at the European Patent Office EPO file no. 0134971. The European Patent Office is at no way liable for those contributions which may supply claims for the contents of information.

Present deelname tijd en oorzaak report	Patiëntnummer date	Patiënt identiteit (voornaam)	Patiëntnummer straat
EP-A- 0307270	15-03-89	JP-A-	1157400
EP-A- 0395292	31-10-90	AU-A- JP-A-	5365290 3130099
EP-A- 0317896	18-10-89	AU-A- JP-A-	3300489 2203800

第1頁の続き

④Int. Cl. "

識別記号 庁内整理番号

//(C 12 N 15/11  
C 12 R 1:44)  
(C 12 N 15/11  
C 12 R 1:01)

⑦発明者 パン・フーベルスウイン, ヒュ  
ベルギー國、ベーー9288・ラールネ、コルマンストラート・62  
一ホ